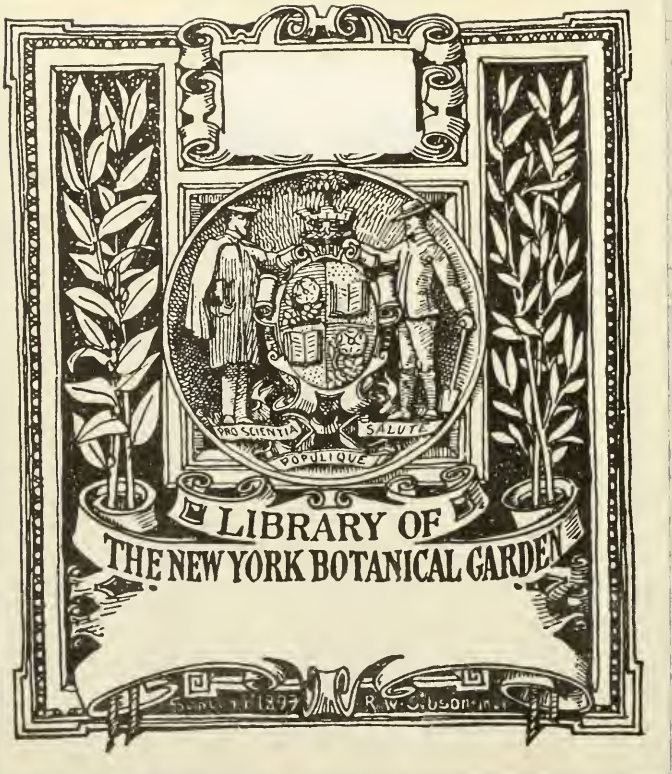

PRO SCIENTIA
SALUTE
POPULIQUE
LIBRARY OF
THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN

FOLIA MICROBIOLOGICA.

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT
: VOOR MIKROBIOLOGIE. :

REDACTIE:

A. KLEIN, GRONINGEN.
J. POELS, ROTTERDAM.
J. G. SLEESWIJK, DELFT.

5E JAARGANG.
: 1919. :

LIBRARY
NEW YORK
BOTANICAL
GARDEN

REDACTIE EN ADMINISTRATIE:
PHOENIXSTRAAT 18, DELFT.
HOLLAND.

XF
.0248
v.5
1919

REGISTER.

Pag.

Aldershoff (H.) 31
Boelens (H. Wigger) 156
Hennepe (B. J. C. te) en Straaten (H. van) 103
Herwerden (M. A. van) 19
Horst (M. D.) 126
Huygens (Christiaan, Oeuvres) 54
Jacobsen (H. C.) 94
Jong (D. A.) 55
Kapsenberg (G.) 166
Poels (J.) 1
Pijper (A.) 50
Rütte (J. G. Le) 143
Smit (Jan) 41
Straaten (H. van) en Hennepe (B. J. C. te) 103

Anorganic Antimony Compounds on Trypanosomes 126
Bactéries dysentériques 55
Dextranlaktococcen (Kapselbildung bei) 41
Garnelenkonserven (Verderber der) 143
Hühnerseuche (Kleinsche) 103
Kleinsche Hühnerseuche 103
Nocardiasis 50
Oeuvres (de Huygens) 54
Randicity (of Vegetable Margarine) 94
Rotlauf (bei Tauben und Enten) 1
Vaccin anti-typhique 31
Volutin 19
Wassermannsche Reaktion . . . . . 156 en 166

FOLIA MICROBIOLOGICA.

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT : VOOR MIKROBIOLOGIE. :

REDACTIE:

A. KLEIN, GRONINGEN.
J. POELS, ROTTERDAM.
J. G. SLEESWIJK, DELFT.

DEEL V, AFLEVERING 1. (DECEMBER 1917).

REDACTIE EN ADMINISTRATIE:
PHOENIXSTRAAT 18, DELFT (HOLLAND).

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP
: VOORHEEN :
: J. C. TH. MARIUS :
GANZENMARKT 4-10, UTRECHT
SPECIALITEIT:
INRICHTING EN COMPLETEERING VAN WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA

MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN VAN CARL ZEISS TE JENA EN R. WINKEL TE GÖTTINGEN

MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN MICRO-PROJECTIE APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN

INHOUD.

Pag.

J. POELS. Rotlauf bei Tauben und Enten und Stammunterschiede bei Rotlaufbazillen 1

M. A. VAN HERWERDEN. Über das Volutin und seine chemische Zusammensetzung 19

H. ALDERSHOFF. Contrôle d'un vaccin antityphique 31

JAN SMIT. Kapselbildung bei Dextranlaktococcen. (Mit 1 Tafel) 41

A. PIJPER. A case of Nocardiasis (with 1 Plate) . . 50

Livres reçus: Oeuvres de Christiaan Huygens 54

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica" veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u.A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Artikel kostenfrei.

Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 2—3 Mal Jährlich. Der Band von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Holländischen Vereinigung für Mikrobiologie) *f* 12.— (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica" sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

Aus dem Reichs-Seruminstitut in Rotterdam.

ROTLAUF BEI TAUBEN UND ENTEN UND STAMMUNTERSCHIEDE BEI ROTLAUFBAZILLEN

VON

Prof. Dr. J. POELS, Direktor des Instituts.

Schon im Jahre 1878 hat R. KOCH nachgewiesen, dasz sich in faulem Blut, so wie in dem Wasser eines Fluszes bei Berlin, namens PANKE, Bazillen befinden, wenigstens befinden können, durch welche Mäuse, wenn diese mit solchem Blut oder mit diesem Wasser subkutan eingespritzt werden, sterben an einer Krankheit, welche KOCH bezeichnete mit dem Namen Mäuseseptikaemie.

Später stellte sich heraus, dasz diese Bazillen eine grosze Ähnlichkeit haben mit den Bazillen, welche die Ursache des Schweinerotlaufs sind. Ziemlich allgemein ist man jetzt der Meinung, dasz die damals von KOCH gefundenen Mikroorganismen für saprophytisch lebende Rotlaufbazillen gehalten werden müssen.

Ähnliche Bazillen, welche KOCH gefunden hat, wurden später auch VON PRETTNER auf experimentellem Wege nachgewiesen, enbenso in Fleisch und Blut, welche in Fäulnis übergegangen waren.

Weiter fand er diese Bazillen in dem Flusz, namens BOTIC, bei Prag, so wie in Schweinefaeces, seltener in Rinderfaeces, aber nicht in Pferdefaeces.

LOEFFLER hat zu wiederholten Malen Mäuse untersucht, welche in unzweckmäszigen Gläser gehalten wurden und starben und in den Kadavern dieser Mäuse fand er immer Rotlaufbazillen.

Eines Tages erhielt er zwei Hamster, von welchen ein Exemplar

gestorben war. In dem Blut dieses gestorbenen Tieres fand LOEFFLER Rotlaufbazillen. Man musz deshalb wohl annehmen, dasz der Ansteckungsstoff des Rotlaufs von mehreren, besonders von kleinen Tieren, kann aufgenommen werden und, wenn diese kleinen Tiere sterben, musz an die Möglichkeit gedacht werden, dasz dadurch der Rotlauf entstehen kann, wenigstens, wenn andere praedisponierende Einflüsze vorhanden sind.

Als im Jahre 1878 die Mäuseseptikaemiebazillen von KOCH nachgewiesen wurden, war die Ursache des Schweinerotlaufs noch unbekannt, und konnten diese Mikroorganismen noch nicht mit den Rotlaufbazillen verglichen werden.

In der Tiermedizin war man im allgemeinen der Meinung, dasz das Auftreten des Rotlaufs, mit Ausnahme der Schweine und Mäuse, bei andern Tieren nicht bekannt war.

Im Jahre 1910 hat Dr. C. SCHIPP aber Rotlaufbazillen gefunden bei einem Huhn, das unter Erscheinungen von Enteritis und parenchymatöser Degeneration des Herzens verendete. Dieses Huhn war ein Exemplar einer Hühnerzüchterei, wo eine grosze Anzahl Hühner in kurzer Zeit gestorben waren.

Seit geraumer Zeit wissen wir auch, dasz Infektionen durch Rotlaufbazillen beim Menschen nicht so selten sind.

Häufig finden diese Infektionen durch Rotlaufimpfstoff, in dem diese Bazillen vorhanden sind, an den Fingern statt. Der infizierte Finger ist, besonders in der Umgebung der Gelenke, angeschwollen, übrigens stark hyperaemisch, und nicht selten sehr schmerzhaft.

Bisweilen breitet der Prozesz sich bis auf den Arm aus und werden geschwollene Lymphstränge beobachtet.

Aus mehreren Nachrichten in der Literatur stellt zich heraus, dasz die Inkubationsdauer bei derartigen Infektionen an den Fingern sich auf 1 bis 4 Tage beläuft, und wird die Aufmerksamkeit gelenkt auf die folgenden Krankheitssymptome: die Finger stark geschwollen und blau-rot; heftige und stechende Schmerzen. Der Schmerz kann so heftig sein, dasz der Patient nicht schlafen kann. In einem Fall noch starke Anschwellung der Finger, nachdem der Prozesz schon 5 Monate gedauert hatte. Auch wird ein Fall mitgeteilt mit tödlichem Erfolg. Dies betraf einen Tierarzt, der sich ziemlich unbedeutend verletzt hatte mit einem Kulturröhrchen, in dem Rotlaufimpfstoff an-

wesend war. Die Finger wurden bald blau-rot, verbunden mit Schwellung. Weiter traten Anschwellung und Rotfärbung an der inneren Armfläche auf, so wie hohes Fieber, indem der Patient sehr unruhig wurde. Als der Patient nach der Klinik transportiert wurde, starb er, nachdem Hände, Hals, Angesicht und Ohren blau-rot gefärbt und angeschwollen waren. Obgleich eine bakteriologische Untersuchung nicht angestellt wurde, unterliegt es keinem Zweifel, dasz es einen Rotlauffall betraf. Abszesze wurden bei diesen Infektionen nicht beobachtet. Ich habe mehrere Male durch Rotlaufbazillen infizierte Finger gesehen und habe immer ungefähr dieselben Erscheinungen beobachtet.

Ich will hierbei nicht unterlassen die Aufmerksamkeit zu lenken auf Prof. ROSENBACH's Mitteilung, der damals Leiter der chirurgischen Poliklinik der Universität in Göttingen war, und welcher, abgesehen von diesen Infektionen durch Rotlaufkulturen, im Jahre 1887, während des 16. Congreszes des deutschen chirurgischen Vereins, Mitteilungen gemacht hat über Hautentzündung der Hände, welche er damals bezeichnete mit dem Namen Erysipeloid, welcher Krankheitsprozesz schon mehrere Male von ihm beobachtet war.

Auf Veranlassung von Prof. ROSENBACH hat J. OHLEMAN im Jahre 1904 die Aetiologie dieses Krankheitsprozeszes als Thema für eine Dissertation näher bearbeitet. Dabei ist ein Vergleich angestellt worden zwischen dem Rotlaufbazillus der Schweine, dem Mäuseseptikaemiebazillus von KOCH und dem Mikroorganismus, der für die Ursache des von ROSENBACH genannten Erysipeloids in Betracht kommt. Diese Hautentzündung der Hände wurde in der Chirurgie schon vor 1884, nach ROSENBACH, bezeichnet mit dem Namen: Erysipelas chronicum, pseudo Erysipelas und Erythema migrans. ROSENBACH hat statt dieser Namen den Namen Erysipeloid eingeführt.

Aus den Untersuchungen stellt sich heraus, dasz die Ursache dieses Erysipeloids ein Mikroorganismus ist, der auszerordentlich viel Ähnlichkeit hat mit den Schweinerotlaufbazillen und auch ROSENBACH ist der Meinung, dasz die Rotlaufbazillen des Schweines, der Mikroorganismus, der die Ursache des Erysipeloids des Menschen ist, und die Bazillen der Mäuseseptikaemie zu einer Gruppe gebracht werden müssen.

Wenn man ROSENBACH's Abhandlung liest und seine schönen Photographien mit einander vergleicht, so musz man wohl zu der Überzeugung gelangen, dasz man hier nur mit verschiedenen Stämmen desselben Parasiten zu tun hat.

ROSENBACH scheint auf den Gedanken gekommen zu sein, dasz zwischen dem Erysipeloid und den Rotlaufbazillen der Schweine Zusammenhang bestehen kann, nämlich durch Vermittlung des Sanitätsrats Dr. LIBBERTZ, der ihm mitteilte, dasz er mit dem Erysipeloid von ROSENBACH ähnliche Krankheiten beobachtet hatte an den Händen von Personen, beschäftigt mit Schweinen, welche an Rotlauf litten.

Nach LIBBERTZ verendeten Mäuse nach Einspritzung von 0.01 c.M.^{3} Erysipeloid-Bouillonkultur, indem 0.01 c.M.^{3} Höchster Rotlaufserum (Susserin) genügte um Mäuse gegen die doppelte Quantität der genannten letalen Dosis zu schützen.

Auch nach Prof. RUPPEL sind diese Erysipeloid-Bouillonkulturen sehr virulent für Mäuse; sogar ein millionster Teil von 1 c.M.^{3} Bouillonkultur sollte Mäuse innerhalb 3—4 Tagen töten.

Auch für Tauben ist die Kultur virulent aber nicht für Caviae.

Das Rotlaufserum wirkt auf die Erysipeloid-Mikroorganismen gerade so wie auf die Rotlaufbazillen, auch hinsichtlich der Agglutination.

Ein Schwein, dasz mit Erysipeloidkultur ingespritzt wurde, bekam einen umschriebenen roten Fleck zur Injektionsstelle und während einiger Tage Fieber. Nach Einspritzung von Rotlaufserum verschwanden diese Krankheitssymptome wieder.

Ein Schwein, das mit Rotlaufserum eingespritzt wurde, zeigte, nach der Injektion von Erysipeloidkultur, keine Reaktion.

Ungeachtet dieser Resultate, ist ROSENBACH der Meinung, dasz der Erysipeloid-Mikroorganismus nicht identisch ist mit den Rotlaufbazillen, aber dasz er gehört zu derselben Gruppe, welche R. würde bezeichnen wollen mit dem Namen Rotlauffäden.

Es kommt mir aber vor, dasz auch hier an Stämme desselben Mikroorganismus gedacht werden musz und dasz unter dem Erysipeloid, von ROSENBACH und andern bei dem Menschen konstatiert, Fälle vorkommen, welche aetiologisch zum Rotlauf gebracht werden müssen, wenigstens die Fälle, von LIBBERTZ beobachtet, welche, wie ich schon mitteilte, vorkamen bei Personen, die mit Rotlauf der Schweine in Berührung kamen.

Es unterliegt keinem Zweifel, dasz der Rotlaufbazillus des Schweines für den Menschen pathogene Eigenschaften hat. Beim Schweine und auch bei Pferden und Rindern, welche für die Serumbereitung mit Rotlaufbazillen immunisiert werden, tritt häufig Arthritis und auch Endocarditis durch diesen Mikroorganismus auf.

Die Entstehung von Arthritis und Endocarditis setzt der Immunisation mit Rotlaufbazillen der obenerwähnten Tiere, behufs der Serumproduktion, grosze Schwierigkeiten entgegen. Vor einiger Zeit erfuhr ich, dasz man beim Leichenschau eines an Endocarditis gestorbenen Menschen Grammfeste Bazillen gefunden hatte, welche vermutlich Rotlaufbazillen gewesen sind.

Es kommt mir sehr erklärlich vor, dasz die Rotlaufbazillen, welche eine ziemlich grosze Pathogenität für den Menschen haben, bei diesem die Ursache der Endocarditis sein können, um so mehr, weil diese Bazillen beim Essen des ungenügend erhitzten Schweinefleisches und durch zufällige Hautverletzungen öfters die Gelegenheit finden werden beim Menschen hineinzudringen.

Dasz diese Bazillen in den Menschenfaeces vorkommen können, zeigte sich ungefähr im Jahre 1891, als in Rotterdam viele dieser Faeces auf Choleravibrionen untersucht wurden. Zu der Zeit bestand die bakteriologische Cholerauntersuchung fast ausschlieszlich im Ausstreichen von Faeces auf Gelatineplatten und ich habe damals einige Male Grammfeste Stäbchen gefunden, und welche, obgleich sie nicht weiter verarbeitet wurden, doch als Rotlaufbazillen betrachtet werden müssen.

Übrigens war von dem Vorkommen von Rotlaufbazillen bei andern Tieren als die obenerwänhten, nicht viel bekannt, bis ich vor einigen Jahre habe nachweisen können, dasz beim Schafe vorkommt eine Arthritis bezw. Polyarthritis, welche durch Bazillen verursacht wird, die mit Rotlaufbazillen ganz übereinstimmen; aber diese Bazillen wuchsen in Gelatine sehr schnell zu bürstenförmigen Kulturen aus.

Damals habe ich in diesem Verein über die diesbezüglichen Untersuchungen Mitteilungen gemacht. Jetzt will ich die Aufmerksamkeit lenken auf das spontane Vorkommen von Rotlauf bei Tauben und Enten.

Bei die beiden letztgenannten Tierspecies sind die Bazillen

nachgewiesen worden von Dr. H. v. STRAATEN, Bakteriologen am Reichsseruminstitut. Zwei gestorbene Tauben wurden zur Untersuchung in genannte Anstalt eingeschickt und bei dieser Untersuchung wurden Symptome von Darmkatarrh und parenchymatöser Degeneration der Organe und haemorrhagische Veränderungen in Endo- und Pericardium gefunden.

Eine Reinkultur von Bazillen wurde aus dem Blut dieser Tiere gezüchtet, welche in jeder Hinsicht Rotlaufbazillen ähnlich sahen.

Weil an die Möglichkeit gedacht wurde, dasz man hier zu tun haben konnte mit Tauben, welche zu Experimenten mit Rotlaufbazillen gebraucht waren, ist eine Untersuchung angestellt worden, aus der sich ergab dasz die Tauben gezüchtet wurden auf dem Hofe, wo sie krank wurden, sodasz wohl angenommen werden musz, dasz diese Tiere auf dem Hofe spontan von Rotlauf angegriffen wurden.

In Bezug auf die konstatierte Krankheit bei Enten, kann ich mitteilen, dasz uns zugeschickt wurden vier plötzlich gestorbene Enten aus Vollenhove in Overijsel, in der Nähe der Südersee, wo ungefähr 70 Enten an dieser Krankheit gestorben waren.

Bei der Sektion der vier gestorbenen Enten wurde Darmkatarrh nachgewiesen und weiter parenchymatöse Degeneration der Organe und zahlreiche Haemorrhagien, besonders am Epicardium. Aus dem Blut und den Organen dieser Enten wuchs in Reinkultur ein Bazillus, der ganz und gar mit den Rotlaufbazillen des Schweines übereinstimmte. Aber auch bei der mikroskopischen Untersuchung war es Dr. v. STRAATEN schon aufgefallen, dasz in dem Blut vorhanden waren Grammfeste Stäbchen, welche die Kennzeichen hatten der Rotlaufbazillen.

Eine Maus, mit diesen Bazillen eingespritzt, verendete nach einigen Tagen und aus den gezüchteten Mäusebazillen stellte sich deutlich heraus, dasz man mit Mikroorganismen zu tun hatte, welche gerechnet werden müszten zu den Rotlaufbazillen zu gehören.

Als Dr. BÜCHLI eine Untersuchung nach dieser Krankheit an Ort und Stelle anstellte, erfuhr man, dasz die Krankheit geherrscht hatte unter Enten, welche man mit faulen Garnelenschalen gefüttert hatte und dasz ungefähr 70 Enten innerhalb einiger Tage gestorben waren. Man musz deshalb annehmen,

dasz diese in Fäulnis übergegangene Nahrung einen praedisponierenden Einflusz auf die Enten ausgeübt hat, durch welchen die Infektion möglich gewesen ist.

Meiner Meinung nach haben wir dabei bestimmt mit einer Infektion per os zu tun und die konstatierte Infektion des Blutes und der Organe bei diesen Enten, war gewisz enterogenen Ursprungs.

Dennoch musz ich darauf hinweisen, dasz eine haemorrhagische Enteritis nicht vorhanden war, nur Symptome einer Darmkatarrh, sodasz es nicht annehmlich sein würde, dasz die Tiere an einer andern spezifieken Darmkrankheit gestorben sind und dasz wir dabei nur mit einer agonalen oder postmortalen Infektion zu tun hatten. Meiner Meinung nach unterliegt es keinem Zweifel, dasz es hier betrifft spontane Rotlauffälle unter dem Einflusz einer praedisponierenden Ursache, in diesem Falle die faulen Garnelenschalen. Auch die konstatierten Haemorrhagien bestärken diese Meinung.

Bemerkenswert ist es, dasz diese Fälle bei den Tauben und Enten im November und Dezember vorkamen, als besonders die Nächte gewöhnlich sehr kalt sind.

Ich lenke hierauf die Aufmerksamkeit, weil es bekannt ist, dasz Vögel, welche normal eine sehr hohe Körpertemperatur haben, sogar bis 43° C., und fast unempfänglich sind u. A. für Milzbrand, zu einer Milzbrandinfektion praedisponiert werden können, wenn diese Temperatur abnimmt. Die Möglichkeit ist weiter nicht ausgeschlossen, dasz die in Fäulnis übergegangene Nahrung direkt oder indirekt eine Herabsetzung der Körpertemperatur bei diesen Enten veranlaszt hat, worüber ich aber nichts mit Gewiszheit mitteilen kann.

Obgleich es bekannt ist, dasz der Schweinerotlauf besonders herrscht, wenn es sehr warmes Wetter ist, dennoch darf man annehmen, dasz die hohe Körpertemperatur bei Vögeln die Ursache ist, dasz eine spontane Infektion durch Rotlaufbazillen übrigens nicht vorkommt und dasz die niedrige Temperatur, wenigstens für Vögel, auf das spontane Entstehen der Krankheit Einflusz haben kann.

Aus der weiteren Untersuchung dieser Entenbazillen ergab sich, dasz diese durch Rotlaufserum agglutiniert wurden und sogar bei sehr hoher Verdünnung, ungefähr ebenso wie gewöhn-

liche Rotlaufbazillen, welche vom Schweine herrühren, durch dieses Serum agglutiniert werden; nur tratt die Agglutination viel später ein. Bei den gewöhnlichen Rotlaufbazillen und derselben Verdünning schon nach 20 Minuten und bei den Entenbazillen erst nach ungefähr 2 Stunden. Es ist bekannt, dasz das Rotlaufserum nicht nur eine agglutinierende Eigenschaft hat gegenüber Rotlaufbazillen, aber dasz es auch eine ziemlich stark in das Auge fallende bakteriotropische Wirkung hat.

Wenn man eine Emulsion von Rotlaufbazillen mit Leukozyten und Rotlaufserum zusammenbringt, so werden bald eine grosze Anzahl Bazillen von den Phagocyten aufgenommen, selbst noch bei einer sehr starken Verdünnung, (1 : 1000).

Obgleich diese von Phagozyten aufgenommenen Bazillen intracellulair nicht bald ihre Eigenschaft um nach Gramm gefärbt zu werden verlieren und der Meinung Metschnikoffs nach auch ihre Lebensfähigkeit dabei behalten, musz dennoch angenommen werden, dasz diese bakteriotropische Wirkung des Rotlaufserums, von einem kuratieven Standpunkt, von nicht zu unterschätzender Bedeuting ist. Ich weise nur auf diese Beobachtung hin, obgleich es keinem Zweifel unterliegt, dasz das Rotlaufserum, welches wegen seiner groszen kuratieven Wirkung eins der besten Sera ist, welche jetzt existieren, noch andere therapeutische Eigenschaften hat.

Aus einer Untersuchung, angestellt von Dr. REESER, Bakteriologen am Reichsseruminstitut, ergab sich, dasz diese bakteriotropische Wirkung des Rotlaufserums anfangs keinen Einflusz auf die gefundenen Entenbazillen hatte, aber, nach dem die Kulturen wiederholt übergeimpft waren, konnte diese Wirkung doch deutlich nachgewiesen werden.

Auszerdem war es sehr auffallend, dasz diese Bazillen eine sehr hohe Virulenz zeigten für Mäuse und Tauben, aber dasz das gewöhnliche Rotlaufserum imstande war infektierte Mäuse und Tauben zu retten, sogar, wenn bei diesen Versuchen die letale Dosis bedeutend überschritten wurde.

Dennoch war die schützende Wirkung des gewöhnlichen Rotlaufserums bei diesen Tieren bedeutend geringer als bei Mäusen und Tauben, welche mit Schweinerotlaufbazillen infektiert waren.

Hieraus geht deutlich hervor, dasz man bei diesen Entenbazillen mit andern Rotlaufstämmen zu tun hat als die, welche gewöhnlich das herrschend Auftreten dieser Schweinekrankheit herbeiführen.

Wir müssen, auf Grund dieser Experimente, annehmen, dasz bei Enten eine mit dem gewöhnlichen Schweinerotlauf übereinstimmende Krankheit vorkommen kann, aber dasz die Bazillen, welche diese Krankheit, wenigstens im vorliegenden Fall, einen andern Stamm repräsentieren.

Eine gesunde Ente, welche mit einer bedeutenden Quantität dieser Kultur eingespritzt wurde, blieb am Leben. Deutliche Krankheitserscheinungen wurden nicht beobachtet. Hieraus musz man annehmen, dasz Rotlauf nur bei Enten vorkommen kann, wenn sehr spezielle Bedingungen erfüllt sind, welche die Widerstandsfähigkeit dieser Tiere gegen die genannten Bazillen aufheben.

Hierin haben wir wieder die Bestätigung der schon längst bekannten Tatsache, dasz viele in der Praxis vorkommende praedisponierende Einflüsse im Laboratorium schwerlich nachgeahmt werden können, besonders auch, weil man die praedisponierenden Einflüsse oft nicht kennt und sie auf jeden Fall nicht genügend beurteilen kann. In Bezug auf das Wachstum dieser Entenbazillen in Gelatine, bemerke ich, dasz dasselbe von dem der gewöhnlichen Rotlaufbazillen abwich. Der bürstenförmige Wuchs tratt minder deutlich oder nicht ein.

Auszerdem hat der Entenbazillus in Bouillonkulturen ein mehr verzweigtes Aussehen, welches bei der Agglutination ans Licht kommt.

Man bekommt den Eindruck, dasz der Mikroorganismus zu einer höheren Gruppe nämlich zu den Hyphomyceten gehört, und es kommt mir vor, dasz der Rotlaufbazillus aus einem höheren Mikroorganismus stammt, der intra vitam diese Eigenschaften mehr oder weniger verloren hat. Die Entenbazillen nähern sich offenbar mehr den saprophytisch in der Natur lebenden Formen. Der Rotlaufbazillus wird, in seiner phylogenetischen Entwickelung, durch diese zufällige Bildung, besser studiert werden können.

Das obenerwähnte Wachstum in Gelatine ist auch bekannt bei Rotlaufbazillen, welche von kranken Schweinen herrühren, wenn der Rotlauf sich dabei spontan entwickelt hat unter dem

Einflusz faules und verschimmelten Futters und ohne vorhergehende Infektion mittels eines andern Tieres. In den Fällen, dasz die saprophytisch lebenden Rotlaufbazillen, unter dem Einflusz eines praedisponierenden Agens beim Schweine mobilisiert werden, kann man dieselben Kulturen bekommen. Es scheint, dasz das typische Wachstum in Kulturen besonders erst dann eintritt, wenn der Mikroorganismus mehrere Passagen durch Tiere gemacht hat.

Ich komme hierbei zurück auf die Mitteilungen von SCHIPP, der in dem Blut und den Organen eines gestorbenen Huhnes, das bei der Sektion Erscheinungen von Enteritis und parenchymatöser Degeneration des Herzens zeigte, Bazillen fand, welche mit den Rotlaufbazillen auch biologisch identisch waren. Diese für Mäuse und Tauben pathogenen Bazillen sind von SCHIPP aber nicht geprüft worden auf ihre Eigenschaften gegenüber dem bakteriotropischen Vermögen des Rotlaufserums. Wohl hat SCHIPP nachgewiesen, dasz das Rotlaufserum seinen Hühnerbazillen gegenüber bei Mäusen eine kuratieve Wirkung hatte ungefähr ebenso wie gegen die gewöhnlichen Rotlaufbazillen.

Auch BROLL hat Rotlaufbazillen bei Hühnern gefunden.

Aus diesen Mitteilungen geht hervor, dasz Rotlauf unter Federvieh wirklich vorkommen kann.

Nun braucht uns dies gar nicht zu wundern, denn Tauben sind u. A. für künstliche Infektionen mit Rotlaufbazillen äuszerst empfindlich, sodasz minimale Quantitäten genügen um, bei Impfung in den Brustmuskeln, diese Tiere tödlich zu infektieren.

Wenn die für Rotlaufbazillen so empfindliche Taube bei der Infektion mit Rotlaufserum eingespritzt wird, so reagiert die Taube fast nicht auf die Infektion, auch nicht, wenn man sogar sehr weit die letale Dosis überschreitet.

Es ist auf diesen Gründen, dasz die Taube im Laboratorium, sich wie kein anderes Tier, für die Kontrolle des Rotlaufserums eignet. Obgleich die Taube experimentell sehr empfindlich ist für Rotlaufbazillen, scheint dennoch das spontan Auftreten dieser Krankheit bei Tauben zu den Seltenheiten zu gehören und müssen offenbar auch bei diesen Tieren für das spontan Auftreten der Krankheit bestimmte, ungenügend bekannte praedisponierende Ursachen angenommen werden.

Wenn wir die hier beschriebenen Bazillen wirklich als Rot-

laufbazillen betrachten müssen, aber das Dasein von Stammunterschieden annehmen, so will ich die Aufmerksamkeit lenken auf die Tatsache, dasz, ebenso von SCHIPP, Rotlaufbazillen ähnlich sehende Mikroorganismen gefunden wurden in der Milz von Rindern, welche unter Erscheinungen, die übereinstimmten mit denjenigen, welche bei Milzbrand auftreten, gestorben waren. Das Rotlaufserum zeigte gegenüber diesen Bazillen bei Mäusen keine kuratieve Wirkung. Auszerdem waren sie nicht nur pathogen für weisze Mäuse, aber auch für Feldmäuse und nicht für Tauben, aus welchem Grunde SCHIPP sich entschlosz, dasz diese von ihm bei Rindern gefunden Bazillen, obgleich sie morphologisch und in Kultur Rotlaufbazillen ähnlich sahen, nicht als Rotlaufbazillen betrachtet werden müssen. Diese Rinderbazillen wurden aber auch nicht von Rotlaufserum agglutiniert.

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, dasz das negative Resultat der Agglutination sich hierbei vollständig deckt mit dem Mangel an kurativer Wirkung des Rotlaufserums bei Mäusen, welche mit diesen Bazillen infiziert waren.

Obgleich die Agglutinine ein Stoff ist, welche, dem allgemein gehuldigten Prinzip nach, aetiologisch mit der Immunität in keinen direkten Zusammenhang steht, ist es dennoch bei diesen Versuchen auffallend, dasz sie mit der positiven, bezw. negativen Reaktion der kurativen oder immunisierenden Antikörper des Rotlaufserums parallel ging.

Weiter wurden noch Rotlaufbazillen gefunden von SCHIPP und von WEITZIG bei einer an septischer Metritis gestorbenen Kuh, indem HAUSER Rotlaufbazillen fand, als eine zufällige Infektion, in dem diphtheritischen Exsudat bei Vögeln.

Beim Schweine kommen nur selten Rotlauffälle vor, gegen welche das übrigens sehr stark wirkende Rotlaufserum unwirksam ist. Wir versuchen in derartigen Fällen die Bazillen der also angegriffenen Schweine zu bekommen, um dieselben bei der Serumbereitung zu benutzen.

Wir müssen aus der praktischen bei der Serovakzination gewonnenen Erfahrung annehmen, dasz auch beim Schweine Rotlaufbazillen vorkommen, welche ganz andere Eigenschaften haben, und gegen welche ein sehr wirksamen Rotlaufserum geringen therapeutischen Wert hat.

Unter den verschiedenen Formen des Schweinerotlaufs kommt

eine Krankheit vor, welche man mit dem Namen Rotlauf der Haut bezeichnen könnte, bei welcher Krankheit die Haut des Schweines stellenweise würfelförmig, haemorrhagisch entzündet ist und von welcher Krankheit die Schweine, auch ohne Serumbehandlung, gewöhnlich genesen. Diese Krankheit ist bekannt unter dem Namen Urticaria.

Man nimmt an, dasz weniger virulente Rotlaufbazillen dieselbe verursachen. Obgleich das Rotlaufserum gegen diese Krankheit in vielen Fällen eine kurative Wirkung hat, treten dennoch Urticariafälle auf, bei welchen die kurative Wirkung dieses Serums äuszerst gering ist.

Es kommt mir vor, dasz in derartigen Fällen das gewöhnliche Stammverhältnis die Ursache ist der geringeren kurativen Wirkung. Von einem praktischen Tierarzt in Deutschland wurde sogar das Vermuten ausgesprochen, dasz Urticaria kein Rotlauf sei, weil das Serum dabei so oft unwirksam bleibe. Wiefern man bei Urticaria auch Fälle annehmen musz, welche durch andere Ursachen entstehen, ist gewisz noch eine ungelöste Frage, aber es kommt mir vor, dasz Stammunterschied der Rotlaufbazillen dabei nicht auszer Acht gelassen werden musz.

Auffallend ist es, dasz lange Formen der Rotlaufbazillen oft vorhanden sind bei Rotlaufendocarditis des Schweines.

Auszerdem ist es bekannt, dasz Urticaria, bei welcher ich öfters lange Rotlaufbazillen züchtete, nicht selten das Auftreten der Endocarditis veranläszt. Ich meine deshalb, auf Grund dieser Beobachtungen, dasz es auch Stammunterschiede gibt bei den Rotlaufbazillen, bei welchen unterschied der Länge der Bazillen zu bestehen scheint und dasz besonders diese längeren Bazillen mehr Neigung haben Endocarditis zu verursachen als die kurzen Bazillen.

Ich habe Grund anzunehmen, dasz ein Schwein gleichzeitig von langen und kurzen Formen infektiert sein kann und dasz die langen Formen ebenso gut wie die kurzen saprophytisch in den Därmen des Schweines leben können.

Einige dieser langen Formen haben als solche eine gewisze Masze der Stabilität in künstlichen Kulturen.

Obgleich es bekannt is, dasz einige Bakterien die sogenannte Reaktion nach Pfaundler zeigen, nämlich in agglutinierendem Serum zu längeren Formen auswachsen, was man auch annehmen

kann von Rotlaufbazillen, welche bei Endocarditis auftreten, weil sie sich dort eigentlich in dem Blutstrom befinden, also mitten in den Agglutininen, kommt mir dies doch nicht genügend vor dadurch die öfters von mir observierten langen Formen der Rotfaufbazillen bei Endocarditis zu erklären.

Nicht unbedeutend ist die Beobachtung von DR. VAN STRAATEN bei einem Schweinerotlauffall, bei welchem die Rotlaufbazillen sich so stark gebogen hatten, dasz sie eine Kommaform repräsentierten.

Obgleich der Rotlaufbazillus ein gerades Stäbchen ist, hatten sich einige dieser Exemplare so stark gebogen, dasz sie die Form einer halben Kreislinie hatten, sogar, bildeten einige einen fast geschlossenen Kreis.

Diese Bazillen kennzeichneten sich durch eine hohe Masze der Virulenz.

Ich habe schon darauf hingewiesen, dasz gewöhnlich die Rotlaufbazillen, welche die Ursache sind einer Endocarditis beim Schweine, sehr lang sind. Diese Bazillen sind gewöhnlich weniger Grammfest und bisweilen auch in den Kulturen, etwas länger.

Bei den obenerwähnten Bazillen sind also allerlei Unterschiede konstatiert, so z. B. Unterschied der Länge der Bazillen, der Dicke, des mehr oder weniger bürstenförmigen Auswachsens der Gelatinekulturen, des verästelten Auftretens, der Pathogenität weiszen Mäusen, Feldmäusen und Tauben gegenüber, des bakteriotropischen Vermögens, des Agglutination-Titers, der kurativen Wirkung des Serums, der Neigung beim Schweine hervorzurufen einerseits eine mit groszer Malignität verlaufende Septikaemie und andernteils ein sogar herrschendes Auftreten einer gutartigen kutanen Form, namens Urticaria.

Es kommt mir vor, dasz man hier zu tun hat mit einem Mikroorganismus, von welchem eine gewisze Anzahl Stämme bestehen, welche nur durch mehrere äuszerliche Unterschiede und Tierpassagen abweichende Eigenschaften bekommen haben, ohne dasz bestimmte Kennzeichen des Parasitismus verloren gingen.

Es scheint, dasz dieser Mikroorganismus ein permanent saprophytisches Dasein führen kann und eine permanent saprophytische Lebensweise wird auf die Dauer mit Eigenschaften verbunden sein, welche, wenigstens auch was die Virulenz

betrifft, sich bedeutend unterscheiden werden von denjenigen, welche bei einer Rotlaufepizoötie zur Ausbildung kommen. Aber die Eigenschaft spezifieke Erkrankung der Haut und Sepsis hervorzurufen ist dermaszen charakteristisch, dasz wir annehmen müssen, dasz diese Haupteigenschaften jedem Einflusz Widerstand leisten.

Sogar der Mikroorganismus, von SCHIPP gefunden bei Rindern, der nicht reagierte, wenigstens nicht bei Mäusen, auf das Rotlaufserum und auch nicht von diesem Serum agglutiniert wurde, hatte beim Rinde eine septische Infektion hervorgerufen und war auch pathogen für weisze Mäuse und Feldmäuse, aber nicht für Tauben.

Wir müssen deshalb wohl annehmen, dasz ein spezifieker Parasitismus bei allen obenerwähnten Mikroorganismen, ungeachtet bestimmter, konstatierter Unterschiede, als eine sehr stabile Eigenschaft in den Vordergrund tritt.

Nun hat der Parasitismus der Rinderbazillen, von SCHIPP gefunden, einen sehr modifizierten Charakter, weil nicht nur weisze Mäuse, aber auch Feldmäuse empfänglich sind, indem Feldmäuse für die gewöhnlichen Rotlaufbazillen Immunität besitzen. Auszerdem war die für Rotlaufbazillen sehr empfängliche Taube für die Rinderbazillen unempfänglich. Auch hatte das Rotlaufserum bei den von Rinderbazillen infizierten Mäusen keine schützende Wirkung, und agglutinierte dasselbe diese Rinderbazillen nicht. Das Serum, mit Rinderbazillen bei Versuchstieren angefertigt, agglutinierte nicht die gewöhnlichen Rotlaufbazillen.

Wenn man diese Bazillen also mit den Rotlaufbazillen vergleicht, so ist der Unterschied wirklich sehr grosz, aber doch ist es eine Tatsache, dasz wir hier zu tun haben mit einem fakultativen Parasit, der sich keinem der jetzt bekannten Mikroorganismen mehr nähert als dem Rotlaufbazillus des Schweines.

Ich habe darum dieses Mikroorganismus erwähnt, weil ich die Aufmerksamkeit habe lenken wollen nicht nur auf die Stämme, welche, auf Grund der morphologischen und biologischen Untersuchung, wenig von den Rotlaufbazillen abweichen, sondern auch auf diejenigen, welche diesen Mikroorganismen durch bestimmte Eigenschaften entfremdet sind, ungeachtet der morphologischen Ähnlichkeit.

Weil diese Rinderbazillen, welche, ebenso wie alle andere obenerwähnten Bazillen, grammfest sind, in den Nährboden, besonders in Gelatine, obgleich mit bestimmten Abweichungen, wie Rotlaufbazillen auswachsen, würde man, wenn die Untersuchung nicht ausführlich stattfand, dieselben mit Unrecht für gewöhnliche Rotlaufbazillen halten können.

Ich habe die Krankheit bei Tauben und Enten bezeichnet mit dem Namen Rotlauf, um dadurch die Eigenschaften des gefundenen Mikroorganismus hervorzuheben; dennoch bin ich überzeugt, dasz der Beweis nicht geliefert worden ist, dasz hierdurch der Rotlauf bei Schweinen direkt kann verursacht werden. Doch gehört diese bei Federvieh konstatierte Krankheit den Namen Rotlauf zu tragen, auch auf Grund der haemorrhagische Veränderungen, in dem Sinne, dasz eine gegenseitige Infektion zwischen Enten und Schweinen nicht angenommen werden kann, wenigstens nicht, wenn praedisponierende Ursachen dabei nicht im Spiele sind. Sind diese wohl zugegen, so halte ich es für wahrscheinlich, dasz alle Stämme dieses Mikroorganismus für Schweine gefährlich sind.

Ich habe bei den von Dr. SCHIPP gefundenen Bazillen die Aufmerksamkeit gelenkt auf Ergebnisse, aus welchen hervor geht, dasz die Agglutination und die schützende Wirkung des Rotlaufserums, sei es in positivem oder negativem Sinne, mit einander übereinstimmten; aber auch bei den Enten-Bazillen finden wir bedeutende Punkte der Uebereinstimmung zwischen der schützenden Wirkung des Rotlaufserums bei Mäusen und Tauben, der Agglutination und der bakteriotropischen Wirkung dieses Serums auf die genannten Bazillen.

Die schützende Wirkung des Rotlaufserums bei Mäusen, mit den Entenbazillen eingespritzt, war geringer als bei Mäusen, injiziert mit gewöhnlichen Rotlaufbazillen des Schweines, aber auch die Agglutination tratt bei den Entenbazillen viel später auf und die bakteriotropische Wirkung war geringer. Dies sind also drei Faktoren, welche jeder für sich in gewiszem Masze imstande sind auf Stammunterschiede bei Rotlaufbazillen hinzuweisen.

Auszerdem ist das Tierexperiment zum Nachforschen dieser Unterschiede von groszer Wichtigkeit. Eine zu hohe Pathogenität für Mäuse oder Tauben kann beruhen auf einem Stammunterschied; Mangel an Pathogenität für diese Tiere ebenso.

Auffallend ist weiter, dasz einige Bazillen, welche von an Rotlauf gestorbenen Schweinen herrühren, eine äuszerst geringe Pathogenität für das Schwein haben, wenigstens bei der experimentellen Untersuchung. Ich spritzte einem Schwein einmal 500 Gramm Bouillonkultur derartiger Bazillen ein, ohne dasz das Tier reagierte. In andern Fällen ist $^1/_2$ c.M^3 ausreichend um ein Schwein tödlich zu infizieren. Auch dieser Unterschied kann man, meiner Meinung nach, nicht einfach durch einen Unterschied der Virulenz erklären. Es kommt mir vor, dasz auch hier an Stammunterschiede gedacht werden musz. Auszerdem kann der abweichende Wuchs in Gelatine zweifellos auf Stammunterschiede hinweisen.

Ich werde davon anführen:

a. Der Rotlaufbazillus wächst in Gelatinekulturen, dem Impfstich entlang, in kleine körnige Kolonien aus, während bürstenförmiger Auswuchs nicht oder sehr sparsam zur Ausbildung kommt;

b. der Bazillus hat in Gelatine-Stichkulturen eine auszerordentlich starke Neigung zur baldigen Bildung groszer bürstenförmigen Auswüchse;

c. die Gelatinekulturen entwickelen sich regelmäszig, aber langsam, zu schönen Bürsten.

Die unter *a* genannte Kulturform in Gelatine deutet auf einen Bazillus, der unter dem Einflusz praedisponierender Umstände bei Schweinen oder Vögeln direkt aus seiner saprophytischen Lebensweise als Parasit auftritt.

Die unter *b* genannte Kulturform deutet auf einen Bazillus, der bei Mäusen, eventuell beim Polyarthritis des Schafes, gefunden wird.

Die unter *c* genannte Kulturform trifft man gewöhnlich an bei Schweinen, welche an Rotlauf gestorben sind, besonders, wenn diese Krankheit einen epizoötischen Charakter hat.

Die Gelatinekultur des Erysipeloids von ROSENBACH wächst schneller aus als *c*, aber weniger schnell als *b*.

Die Rinderbazillen von Dr. SCHIPP wachsen aus wie die bekannten saprophytischen Formen, welche mobilisiert werden unter praedisponierenden Umständen.

Der Hühnerbazillus von Dr. SCHIPP dagegen wächst aus wie *b*.

Man kann also die Gelatinekultur, mit Rücksicht auf *die Stammunterschiede,* verteilen in:

1. normal wachsende Stämme; die gewöhnliche Rotlaufstämme;
2. langsam wachsende Stämme;
3. schnell wachende Stämme.

In Bezug auf die Serumtherapie musz man annehmen, dasz all diese Formen beim Schweine Rotlauf verursachen können, aber die unter a und b genannten Stämme werden nur dazu imstande sein, wenn eine stark praedisponierende Ursache mit hilft und diese Stämme werden offenbar niemals ein herrschendes Auftreten der Krankheit veranlassen. Sie werden blosz in Betracht kommen sehr beschränkte Enzoötien hervorzurufen. Der gewöhnliche Rotlaufbazillus ist mehr akkommodiert an den Organismus, in dem er den Rotlauf verursachte. Das Rotlaufserum hat offenbar die meiste kurative Wirkung gegen die Bazillen, welche Neigung haben zur Veranlassung eines herrschenden Auftretens der Krankheit.

Der Urticariabazillus musz, meiner Meinung nach, als einen einzelnen Stamm betrachtet werden, basiert auf den milden Verlauf dieser Krankheit, der sogar in den milden Formen herrschend auftreten kann. Auszerdem ist das nicht selten konstatierte eigentümliche Verhältnis des Rotlaufserums gegenüber dieser Krankheit eine Stütze für die Meinung, dasz hier Stammunterschiede im Spiele sind.

Jetzt will ich noch die Aufmerksamkeit darauf lenken, dasz die öfters auftretende Infektion durch Rotlaufbazillen an den Fingern bald heilt, wenn Rotlaufserum eingespritzt wird, aber dasz sie auch bald heilt, wenn man der angegriffene Finger in Borsalbe mit Watten wickelt. Bald nehmen dadurch die Anschwellung, die rote Farbe und die Schmerzen ab und wenn man nach einigen Tagen den Verband, je doch zu früh, entfernt, treten Rezidive auf. Die Anschwellung, die Schmerzen und die Hyperaemie nehmen wieder zu. Wenn man den Finger dann wieder gehörig einwickelt, so tritt bald Besserung und völlige Wiederherstellung ein.

Bei dieser Behandlung ist eine Einspritzung mit Rotlaufserum nicht nötig.

Unsere Untersuchung über Stammunterschiede, besonders bei den Rotlaufbazillen, wird im Reichsseruminstitut fortgesetzt,

und ich hoffe später in der Lage zu sein hierauf in diesem Verein zurückzukommen.

Auch haben wir angefangen ein Pferd mit Entenbazillen zu immunisieren und für die Serumproduktion fertig zu machen. Wenn dieses Pferd genügend präpariert worden ist, können weitere vergleichende Untersuchungen stattfinden, über welche ich später Mitteilungen machen werde.

(Aus dem physiologischen Institut
der Universität in Utrecht).

ÜBER DAS VOLUTIN UND SEINE CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG. [1])

VON

Frl. Dr. M. A. VAN HERWERDEN.

Der Botaniker A. MEYER [2]) hat im Jahre 1904 den Versuch gemacht die chemische Zusammensetzung der seit längerer Zeit bei einzelligen Organismen beschriebenen basophilen Körner im Zellplasma kennen zu lernen. Bekanntlich waren es ebenfalls MEYER und sein Schüler GRIMME [3]), welche den Namen Volutinkörner einführten statt des noch jetzt von den französischen Autoren gebräuchlichen Namen »metachromatische Körper«. [4]) Das Verhältniss Säuren und Basen gegenüber, die Basophilität, welche in Gegensatz zu derjenigen anderer basophilen Zellbestandteilen nach kurzem Aufenthalt in einprozentiger Lösing von Schwefelsäure beibehalten wird, besonders das übereinstimmende Benehmen einer in vitro untersuchten Nucleinsäureverbindung gab MEYER Anlass die Volutinkörner als Nucleinsäure-

[1]) Eine ausführlichere Arbeit ist in den »Verslagen der Koninkl. Akad. van Wetensch.« (Bd. XXV S. 1445) erschienen.

[2]) Botan. Zeitung 1904. S. 113.

[3]) Zentralbl. f. Bact. Bd. XXXII 1902. S. 172.

[4]) Ich werde den Namen Volutin beibehalten, weil die metachromatische Farbe nicht unter allen Umständen auftritt und übrigens sehr abhängig vom benutzten Methylenblaupräparate ist. Es wurde z. B. mit Methylenblau β-patent mehr Metachromasie in denselben Kulturen angetroffen als mit Methylenblau für Bacterien Grübler, welches letztere Präparat vermutlich reiner ist. Mit Toluidinblau dagegen sind fast sämmtliche Volutinkörner metachromatisch gefärbt.

Verbindungen zu betrachten; eine Auffasung, welche in der späteren Litteratur übergenommen ist ohne dass seitdem bessere Belege beigebracht sind. MEYER selbst hat schon eingesehen, dass die von ihm angestellten Reaktionen — was die chemische Forderungen betrifft — nicht genügten den Beweis dieser Hypothese zu bringen, wie aus seiner eigenen Bemerkung S. 125 hervorgeht, an welcher Stelle er deutlich sagt, dass der endgültige Beweis, dass Volutin eine Nucleinsäureverbindung sei, noch nicht geliefert ist. Auch Guilliermond [1]), der sich für die morphologischen Kenntnisse dieser basophilen Körner sehr verdienstlich gemacht hat, schreibt 6 Jahre nach MEYER's Arbeit, dass — was die chemische Zusammensetzung betrifft — »aucune preuve décisive« herbeigeführt sei (S. 307); und aus dem bekannten Handbuch KOHL's über die Hefepilz 1907 (S. 40) zitiere ich den folgenden Satz: »Über die chemische Natur wissen wir nichts sicheres. Was darüber behauptet wird, hat das Stadium des Hypothetischen noch nicht überwunden«

Wäre es vielleicht möglich mit einem feineren microchemischen Reagenz als MEYER und seinen Nachfolgern zur Verfüging stand, diese Frage zu lösen? Ist tatsächlich das Volutin eine Nucleinsäureverbindung, so könnte man erwarten, dass diese Substanz von der *Nuclease*, dem nucleinsäure-spaltenden Enzym gelöst wird. In Zusammenhang mit anderen Untersuchungen über die Nucleasewirkung auf die Zelle, habe ich ebenfalls das Volutin von verschiedenen Hypho- und Blastomyceten mit einer aus der Rindermilz bereiteten Nuclease verdaut. Dieser Versuch schlug fehl, weil schon innerhalb der für die Verdauung nötigen Zeit das Volutin in reinem Wasser gelöst wird. Ein anderer Weg hatte mich jedoch schon damals zur Auffassung gebracht, dass die MEYER'sche Hypothese richtig sei. Es gelingt nämlich, durch Anwendung des nucleinsäure-spaltenden Enzyms der lebendigen Pilzzellen selbst, die Volutinkörner eines in Alkohol fixierten Ausstrichpräparates in kurzer Zeit zum Verschwinden zu bringen, während die vorher mit Formoldämpfen abgetöteten Zellen hierzu nicht im Stande sind. [2])

Das allgemeine Vorkommen des Volutins in Bacterien, Hypho-

[1]) Arch. f. Protistenkunde, Bd. XIX, 1910, S. 298.

[2]) Für die Beschreibung dieser Versuche bei Ustilago maydis und bei einer Torula, siehe Anat. Anzeiger Bd. XLVII, 1914, S. 312.

und Blastomyceten und Protozoen, die grosse Verbreitung in den Zellen nebst Fett und Glycogen, liess eine endgültige Entscheidung über die chemische Natur als sehr erwünscht erscheinen. Ich habe mich daher die Frage vorgelegt, ob es nicht andere Wege als die obengenannten giebt, diese Entscheidung herbei zuführen nicht. Unentbehrlich für das Leben der Pilze ist jedenfalls das Volutin nicht. Es gelingt nämlich sehr gut verschiedene dieser zu kultivieren und sich vermehren zu lassen ohne dass Volutin in der Zelle gebildet wird.

Schon war aus früheren Untersuchungen bekannt, dass bei ungenügender Nahrung die Quantität Volutin in der Zelle verringert wird, dass sogar ein Teil der Zellen das Volutin gänzlich verlieren kann. Auch hat im Jahre 1910 REICHENOW [1]) angegeben, das es mit einer Nahrung ohne Phophatzusatz, möglich sei, bei Haematococcus pluvialis das Volutin vollkommen verschwinden zu lassen, was aber bald nachher den Tod des Haematococcus veranlassen sollte.

Bei meinen eigenen Versuchen mit Ustilago maydis und Torula hatte ich ebenfalls den Einfluss des Phosphatgehaltes des Nährbodens auf das Volutin beobachtet und den speziellen Versuch gemacht Dauerkulturen zu bekommen, welche das Volutin vollkommen entbehrten. Hierzu genügt es bei den Agarkulturen nicht bloss das Phosphat weg zu lassen; es bleibt wohl in einem grossen Teil der Zellen das Volutin aus; daneben giebt es in einem Alkohol-ausstrichpräparate aber viele Zellen, welche das Volutin behalten haben.[2]) Weil es nicht tunlich ist in der lebenden Zelle das Volutin von den Glykogentropfen im Zellplasma zu unterschieden, war es zur Kontrole der Kulturproben nötig Ausstrich-präparate zu fixieren und in der üblichen Weise mit Methylenblau und einprozentiger H_2SO_4 zu behandelen. Es genügte hierzu bei Ustilago und Torula eine Alkoholfixation, bei welcher nicht wie bei Saccharomyces die Methylenblaufarbe des Zellkörpers ungenügend durch Schwefelsäure ausgezogen wird, weshalb bei dieser letzteren Hefeart eine Formolfixierung vorzuziehen ist.

Es wurde bei der Zusammensetzung des Nährbodens, was die

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. XXXIII, 1910, S. 1.

[2]) Vermutlich können die von mir untersuchten Hypho- und Blastomyceten kleinere Quantitäten Phosphorverbindungen der Umgebung entziehen als die von REICHENOW kultivierten Haematococcen.

eigentlichen Nahrungsbestandteile betrifft, ausschliesslich mit chemisch reinen Präparaten gearbeitet. Der Agar wurde während einer Stunde in 0.5 prozentiger Essigsäure ausgezogen und nachher wiederholt in destilliertem Wasser gewasschen ; Leitungswasser habe ich niemals benutzt. Als Nahrungsmittel sind im Anfang 5 prozent Glykose (pro analysi) 0,5 prozent Pepton MERCK, 0,05 prozent $MgSO_4$ (pro analysi) und eine Spur KNO_3 (pro analysi) gebraucht.

Untersucht man diesen Nährboden macrochemisch auf Phosphor, mit der NEUMANN'schen Methode[1]), so stellt sich heraus, das dieser sorgfältig bereitete Boden nicht vollkommen phosphorfrei ist, was hauptsächtlich von dem Pepton verursacht wird. Sobald man nämlich als N.-Quelle statt des Peptons Glycocoll oder Asparagin benutzt, bleibt nach der Zersetzung macrochemisch die Phosphorreaktion aus; auch in diesem letzteren Fall werden aber microchemisch noch Spuren Phosphor angetroffen [2]).

Auf diesem sorgfältig met Glycocoll oder Asparagin bereiteten Agarboden ist schon nach der zweiten Impfung am einer Malzagarkultur von Torula monosa [3]) nach wenigen Tagen keine einzelne Zelle mit Volutin zu finden. Das Wachstum ist aber geringer als in der phosphatfreien Peptonkultur und weil auch in dieser letzteren höchstens eine volutinhaltende Zelle unter tausend volutinfreien nachzuweisen ist, habe ich das Pepton MERCK für verschiedene Versuche benutzen können. Auch in dieser phosphatfreien Peptonkultur ist immer noch die Vermehrungsfähigkeit geringer und das Wachstum weniger kräftig als auf dem phosphathaltenden Nährboden. Es gelang mir nicht einen Nährboden zu bereiten in welchem sich auch microchemisch kein Phosphor nachweisen liess; es bleibt vermutlich auf solchem Boden, falls dieser zu bereiten ist, das Wachstum vollständig aus.

In dieser Weise habe ich volutinfreie Kulturen von Ustilago maydis, Torula monosa[3]), Saccharomyces cerevisiae und einer Lactose-hefe [3]) (ebenfalls eine Torula-art) bereitet.

Nach Überimpfung auf einen phosphathaltenden Boden gelang

---

[1]) Siehe HOFFE SEYLER, Handbuch d. physiol. und pathol. chem. Analyse, S. 359.

[2]) Hierzu wurde ein Teil des Nährbodens verbrennt, die Asche in einen Tropfen Salpetersäure auf ein Objekt-glas gebracht und unter dem Microscop reagiert.

[3]) Über Torula monosa und Lactosehefe siehe KLUYVER. Biochem. Suikerbepalingen, Inaug. Diss. Delft, 1914. S. 16 und S. 4.

es innerhalb einiger Stunden — in flüssigem Medium öfters innerhalb weniger Minuten — die Zellen wieder mit Volutin gespeichert zurück zu finden. Dies gilt ebenfalls für Kulturen, welche Monate lang (8 à 9 Monate) volutinfrei gelebt haben und also die Fähigkeit behalten haben Volutin zu bilden, sobald ihnen dazu die Gelegenheit geboten wird. Auf geringem Phosphorzusatz reagieren die volutinfreien Zellen äusserst prompt; so vermag der Zusatz von 0,04 mgr. $K H_2 P O_4$ auf 10 cM^3 Flüssigkeit schon eine Volutinbildung in verschiedenen Zellen auszulösen. Ebenfalls aus organischer Substanz wird der für das Volutin nötige Phosphor aufgenommen. Nach Zusatz von einer von mir aus Eiereiweiss bereiteten Albumose, welche 0,09 mgr. Phosphor auf einem Kulturglas enthielt, war bald ein groszer Teil der vorher volutinfreien Zellen volutinhaltend geworden und dasselbe gilt für den Zusatz von Nucleinsaüre-Natrium.

Aus dem vorhergehenden ersieht man, dass für die Volutinbildung die Gegenwart von Phosphor notwendig ist. Nicht wie HENNEBERG [1]) angiebt Calcium- oder Ammoniumsalze oder Zucker, sondern auschliesslich diese Phosphorverbindungen sind im Stande in volutin-freien Zellen das Volutin zur Neubildung zu bringen. Das wirksame Bestandteil sind nicht die Calciumsalze, sondern die Phosphate des Leitungswassers. Der Befund HENNEBERG'S, dass in einer Bierhefekultur, welche viel Volutin verloren hat, kurze Zeit nach einem Aufenthalt in Zuckerlösung (besonders nach Zusatz von Ammoniumcarbonat) Neubildung des Volutins stattfindet, ist, meiner Meinung nach, nur so zu deuten, dass vermutlich die benutzen Präparate nicht chemisch rein gewesen sind. Wie ich mich selbst überzeugen konnte, verursacht Handelsglykose oder Rohrzucker tatsächlich eine Vermehrung oder Neubildung des Volutins; in vollkommen reiner Glykose (pro analysi) mit oder ohne Zusatz von Ammoniumcarbonat (pro analysi) wird dagegen kein Volutin gebildet.

Behandelt man Torula monosa bei Zimmertemperatur mit $\frac{n}{15}$ NaOH, so wird das Volutin vollständig gelöst. Es ist dieselbe Methode, welche man für die Nucleinsäurebereitung aus Hefe benutzen kann. Ist es vielleicht das Volutin, welches hierzu das Material schafft? Schon MEYER hat diese Hypothese ge-

[1]) Centralbl. f. Bacteriol., Bd. XLV, 1916, S. 50; Wochenschrift f. Brauerei 1915, No. 36—42.

äussert, weil er es — in Zusammenhang mit seinen obenerwähnten Volutinreaktionen — für unwahrscheinlich hielt, dass das geringe Quantum Chromatin der Hefekerne die ganze Menge Nucleinsäure, welche man aus Hefe zu bereiten vermag, zu liefern im stande sei.

Es wurden 25 Malzagarkulturgläser von mir mit Torula monosa geimpft, 48 Stunden später die reichlich gewachsenen Kulturen mit $\frac{n}{15}$ Na O H ausgespült, die in dieser Weise erhaltene Suspensionsflüssigkeit eine Stunde nachher (als alle Zellen in einer Probe volutinfrei waren) durch ein Saugfilter mit Papierpappe bereitet, filtriert und alsdann jedem 10 cM³. des Filtrats 1 cM³ 5 prozentiger Lösung H_2SO_4 zugesetzt. Die durch zentrifugieren erhaltene Fällung wurde mit destilliertem Wasser nachgespült. Im Autoclav mit verdünnter Schwefelsäure hydrolisiert, gab diese eine deutliche Xanthin- und Adenin-reaktion und ebenfalls nach weiterer Zersetzung eine Phosphor-reaktion. Die Analogie mit der Nucleinsäurebereitung aus Hefe liess schon, wie jetzt bestetigt wurde, erwarten, dass die obengenannte Fällung Nucleinsäure enthielt (ich habe übrigens später auch mit Handelshefe dieselben Reaktionen angetroffen).

Es lässt sich nun nachweisen, dass die Nuclease der Hefezellen selbst im Stande ist, diese Nucleinsäureverbindung zu zersetzen und Phosphorsäure abzuspalten. Wenn man eine Suspension der obengenannten ausgewaschenen Fällung mit 1 prozent Glykose und 0.05 prozent Mg S O_4 in Wasser zusammenbringt und diese Flüssigheit mit Torula monosa impft, gelingt es nicht eine Phosphatreaktion zu erhalten. Dies ist aber wohl der Fall, wenn man die vorher mit Quarzerde zerriebenen Hefezellen mit einer Suspension der obengenannten Fällung in Wasser nach Thymol-zusatz zusammen bringt. Nach einem Aufenthalt von 48 Stunden bei Zimmertemperatur erhält man ein deutliche Phosphatreaktion, welche der Fällung selbst, sowohl wie den zerriebenen Hefezellen gesondert, abgeht. Dass die Nucleasewirkung der lebendigen Zellen nicht durch eine Phosphatreaktion aufzudecken war, is vermutlich der unmittelbaren Benutzung der aus der Nucleinsäure befreiten Phosphate von diesen Zellen selbst, zuzuschreiben. Sobald man aber die vorher zerriebenen Zellen nimmt, ist es möglich die Nucleasewirkung der Torula monosa nachzuweisen. Diese Enzymwirkung geht, wie ich be-

tonen möchte, auch in der volutinfreien Kultur nicht verloren; denn auch mit dieser gelingt es eine Phosphatreaktion zu erhalten.

Bei derselben Bearbeitung, welche das Volutin der Zelle entzieht, geht also eine Nucleinsäure-verbindung in Lösing. Wie sehr wahrscheinlich nach den obrigen Ausführungen die Identität dieser Substanzen sein mag, doch wird erst der überzeugende Beweis durch die Beobachtung geliefert, dass aus *phosphatfreien* mit $\frac{n}{15}$ Na O H ausgezogenen Kulturen, denen das Volutin abgeht, mit 5 Prozentigen Schwefelsäure keine Fällung zu erhalten war. Es wurden 25 Kulturgläser mit volutinfreier Torula (höchstens ein Volutenkörnchen auf 1000 Zellen) mit $\frac{n}{15}$ Na O H behandelt, nach einer Stunde durch das Saugfilter filtriert und mit Schwefelsäure versetzt. Mit 1 cM^3 5 prozentigen H_2SO_4 pro 10 cM^3 Fitrat bekam man höchstens eine sehr leichte Trübung, niemals — auch nicht nach dem Zentrifugieren — eine Fällung. Hiermit sei keineswegs gesagt, dass die volutinfreie Kultur keine Nucleinsäure enthält, denn bei der Zersetzung grosser Quantitäten Hefe wird es allerdings gelingen die Nucleinsäure aus dem Kernchromatin nachzuweisen. Wohl ist aber durch diese Versuche der Beweis geliefert, dass volutinfreie Torula monosa *bedeutend weniger* Nucleinsäure enthält als die volutinhaltende normale Torula. Mit gutem Recht darf man also sagen, dass die Nucleinsäure, welche man in der üblichen Weise aus Hefe bereitet, grössenteils dem Volutin zu verdanken ist.

Die Tatsache, dass man Monatelang die volutinfreien Kulturen im Leben zu halten vermag, ohne dass sie auf phosphathaltenden Boden übergeimpft, die Fähigkeit verloren haben, Volutin zu bilden, beweist, dass für das Leben der Art diese Nucleinsäureverbindung nicht notwendig ist. Wohl gestalten sich jedoch die Lebensverhältnisse günstiger für die volutinhaltenden Zellen; ihre Vermehrungsfähigkeit ist grösser, die Zellgrösse oft bedeutender; es wäre auch beschwerlich zu erwarten, dass eine Substanz, welche in so grösser Menge in jeder Hefezelle vertreten ist, dort nicht eine Leistung zu erfüllen hätte. Ob es der Mangel an Volutin oder bloss der Mangel an Phosphaten ist, welcher einigermassen das Wachstum hemmt, war in meinen Versuchen nicht zu bestimmen. Theoretisch wäre es natürlich denkbar, dass, auch unabhängig von der Volutinbildung, dem Protoplasma der Hefezelle durch diesen Phosphatmangel ein Reiz

fehlt, welcher nicht durch andere Salze zu vertreten ist. Es sei übrigens nochmals gesagt, dass in diesen phosphatfreien Kulturboden auch microchemisch immer noch Spuren von Phosphor nachweisbar sind, welche die Zelle zur Kernvermehrung zu assimilieren vermag. Sonst wäre wohl jedes Wachstum ausgeschlossen. Die einzelnen in der Litteratur erwähnten Fälle, dass auf vollkommen phosphorfreiem Boden Pilzzellen sich vermehrten, sind — was die chemische Analyse betrifft — nicht einwandsfrei.

Während die meisten Forscher das Volutin als Reservestoff betrachten, hat neulich HENNEBERG [1]) dieser Substanz eine sehr bedeutende Rolle zugeschrieben beim Gährungprozess des Saccharomyces cerevisiae und dieser Autor neigt sogar dahin, das Gährungsenzym selbst im Volutin zu suchen. Durch eine grosze Versuchsreihe hat HENNEBERG diese Auffassung bestätigen wollen, bei welchen Versuchen der Gehalt an Volutin und die Verteilung über die Zellen zurselben Zeit mit der Gährfähigkeit in Betracht gezogen wurden.

Die Möglichkeit während längerer Zeit volutinfreie Hefe- und Pilzkulturen in Leben zu halten, liess für mich die Frage sich sehr einfach gestalten: Ist die Gegenwart des Volutins notwendig für den Gährungsprozess? Hierzu genügt es, die volutinfreien Kulturen unter microscopischer Kontrole für den Gährungsversuch zu benutzen. Sobald es sich ergab, dass tatsächlich ohne Volutin Gährung stattfindet, war es angewiesen, quantitatieve Bestimmungen über das Gährungsverhältniss volutinfreier und volutinhaltender Kulturen zu machen.

Für diese Versuche habe ich einerseits die Kohlensäurebildung kontroliert, anderseits nach den BENEDICT'schen Methode die Reduktionsfähigkeit des Zuckerrestes bestimmt [2]). Es versteht sich, dass die Versuchsflüssigkeiten steriel gehalten wurden. Bei der erstgenannten Methode wurde die Kohlensäure oberhalb Quecksilber bei einer Temperatur van 23—25° aufgefangen.

Aus den Versuchen ergab sich, dass nach beiden Methoden in den volutinfreien Kulturen von Torula monosa, Saccharomyces

---

[1]) Centralbl. für Bacteriol. Bd. XLV, 1916. S. 50; Wochenschrift f. Bräuerei 1915. No. 36—42.

[2]) Was diese Methode betrift, siehe NAGASAKI, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 95, S. 61.

cerevisiae und Lactosehefe Gährung stattfindet. Die benutzte Flüssigkeit war phosphatfrei und enthielt 1 à 3 prozent Glukose, 0,05 prozent $MgSO^4$, eine Spur KNO^3 und 0,2 prozent Pepton, oder — falls man sicher sein wollte, dass auch auf tausenden Hefezellen keine einzelne Zelle mit Volutin vorkommt — 0.2 prozent Glycocoll oder Asparagin statt des Peptons. Praktisch ist aber auch das Pepton brauchbar, nämlich bei den vergleichenden Gährungsversuchen. Pepton hat nämlich, wie gesagt, den Vorteil dass das Wachstum weniger gehemmt wird. In der in dieser Weise zusammengesetzten Flüssigkeit wurde eine Platinöse mit Hefezellen geimpft und sowohl im Anfang als am Ende des Versuchs kontroliert, dass kein Volutin anwesend sei. Dieselbe Flüssigkeit mit Zusatz von 0.1 prozent KH_2PO_4 wurde für die volutinhaltende Kontrole gebraucht. Auch habe ich öfters die ganze volutinfreie Kultur eines Nahrbodens in einen Kolben mit phosphatfreier glykosehaltender Flüssigkeit gebracht und die Gährung mit einer solchen verglichen, welche durch ein annäherend gleiches Quantum Torula monosa-Zellen mit Volutin in demselben flüssigen Medium zustande gebracht wurde. In dieser letzten Weise habe ich mehr Übereinstimmung im Gährungsmedium gebracht als wenn die Kontrole-flüssigkeit Phosphat enthielt; eine volkommene Übereinstimmung aber nicht, weil wie früher gesagt, diese volutinreichen Zellen selbst wieder der neuen Nährflüssigkeit Phosphat übertragen können. Ich wähle hier ein Paar Beispiele aus meinen Versuchsreihen: [1])

3 April 1917. In einem Kölbchen 25 cM^3 2.5 prozent Glykose. 0,2 procent Pepton, 0.05 procent $Mg\ SO_4$ und eine Spur $K\ N\ O_3$. Impfung mit volutinfreier Kultur von Torula monosa, welche 30 März auf phosphatfreien Boden übergeimpft wurde und aus einer ebenfalls phosphatfreien Kultur von 19 Juni 1916 herstammt. Die Kohlensäure wurde über Quecksilber abgelesen. Nach 2 Stunden Quecksilbersäule 3,5 cM^3 heruntergefallen. (*Also Gährung in einer seit 9 Monaten volutinfreien Kultur*).

März 1917. Kölbchen A mit Glykose, 0.2 prozent Asparagin, 0,05 prozent $MgSO_4$ und eine Spur KNO_3. Kölbchen *B* dieselbe Flüssigkeit + 0,1 prozent KH_2PO_4. *A* geimpft mit

---

[1]) Für die anderen Versuche und für die ausführliche Erklärung siehe: »Verslagen der Koninkl. Akad. van Wetensch.« Bd. XXV, Blz. 1445.

volutinfreier, *B* mit volutinhaltender Kultur der Lactosehefe. Vor der Vergährung Reduktionsbestimmung nach BENEDICT = 2,04 prozent Glykose; 48 Stunden später *A* 1,53 prozent, *B* 1,44 prozent.

Ähnliche Versuche haben mich überzeugt, dass nicht nur bei Torula monosa und Lactosehefe sondern auch bei Saccharomyces cerevisiae, unabhängig vom Volutin Gährung stattfindet und dasselbe gibt vermutlich für andere Hypho- und Blastomyceten. Dass in einigen Versuche die Gährung in derselben Zeit etwas intensiver im phosphathaltigen Medium ausfällt, ist sehr erklärlich, weil das Volutin in letzterem Fall kräftiger wächst und die Zahl der an der Gährung beteiligten Zellen grösser sein wird. Auch weiss man, dass im Allgemeinen die Gegenwart von Phosphat die Gährung befördert und es ist unmöglich die Versuche so einzurichten, dass man diesen Einfluss unabhängig von der Volutinbildung studiert. Nach HARDEN und YOUNG [1]) soll sogar das Phospat eine notwendige Substanz sein, ohne welche die Gährung ausbleibt. Bekanntlich findet der Gährungsprozess nach diesen Autoren in der folgenden Weise statt:

$C_6H_{12}O_6 + 2PO_4\,NA_2H = C_6H_{10}O_4\,(PO_4Na_2)\,2 + 2CO_2 + 2C_2H_5OH + 2H_2O.$

$C_6H_{10}O_4\,(PO_4Na_2)_2 + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2PO_4Na_2H.$

Aus meinen Versuchen geht jetzt hervor, dass Spuren einer Phosphorverbindung welche zu gering sind Volutin zu bilden, noch — falls die HARDEN und YOUNG-sche Vorstellung richtig ist — genügen diese chemischen Umsetzungen zu bewirken. Dass dies organische und keine anorganische Verbindungen sind, braucht kein Hinderniss zu sein; ich erinnere nur an die Nucleasewirkung, welche, wie ich beschrieben habe, auch den volutinfreien Zellen nicht abgeht.

Weder die Zymase-, noch die Nucleasewirkung sind also an der Gegenwart des Volutins gebunden und, wie ich nachweisen konnte, gilt ähnliches für die Katalasewirkung. Vollkommen volutinfreie Zellen in 3 prozent H_2O_2 gebracht, verursachen sofort eine kräftige Sauerstoff-entwicklung; bei vorher durch Hitze abgetöteten Zellen findet in H_2O_2 keine Gasbildung statt.

---

[1]) Proceedings of the royal society, vol. LXXXII, p. 321. Siehe ebenfalls EULER und HAMMARSTEN, Biochem. Zeitschr. Bd. LXXVI, 1916, S. 314.

Dass HENNEBERG bei Saccharomyces cerevisiae zu anderen Resultaten kam, was die Zymasebilding betrifft, ist, wie gesagt, vermutlich hieran zuzuschreiben dass ähnliche Fragen nur einwandsfrei zu beantworten sind, wenn man im Stande ist die Volutinbildung vollkommen zu vermeiden. Denn wie HENNEBERG selbst sagt, kann immer in seinen Versuchen das Volutin der Zelle aus dem Kulturmedium regeneriert werden. Wenn HENNEBERG in Zuckerwasser ohne Salzzusatz Regeneration des Volutins beobachtet, ist es wohl nicht der Zucker, welcher hier der wirksame Bestandteil ist, — denn in Glykose pro analysi findet keine Neubildung statt, wie ich wiederholt gefunden habe. Als einige Monate her die Glykose weniger rein abgeliefert wurde, sind aber in allen meinen Kulturen ohne Phosphatzusatz verschiedene volutinhaltenden Zellen aufgetreten.

Ist also der Beweis geliefert, dass die Substanz, welche die von MEYER nachgewiesenen Farbereaktionen giebt, nicht der Mutterboden des Enzyms sein kann, so könnte man sich noch die Frage stellen, ob vielleicht nach dem Verschwinden dieser Farbereaktionen, die wichtigsten Bestandteile des Volutins vielleicht in der Zelle liegen bleiben. Hier lässt sich aber sofort antworten, dass – wie man S.7 gesehen hat – mit verdünntem Alkali aus den volutinhaltenden Torulazellen eine Nucleinsäureverbindung ausgezogen wurde, welche man mit derselben Methode nicht aus einer ähnlichen Menge volutinfreie Torula erhält. Es ist also nicht bloss eine Farbereaktion, welche durch unbekannte Umsetzungen in der Zelle verloren geht, sondern zweifellos eine Nucleinsäure-verbindung, welche die Torula auf phosphatfreiem Boden verliert. Es lässt sich also mit gutem Recht sagen, dass diese Nucleinsäureverbindung *für die Enzymwirkung nicht notwendig ist.* Ebenso wenig ist sie nötig für das Leben der Art, denn die Torula monosa hat nach 9 Monaten Aufenthalt auf phosphatfreiem Boden die Artkennmerke behalten, auch die Fortpflanzung geht — obwohl in verlangsamtem Tempo regelmässig weiter. Eine solche Kultur, nach 9 Monaten auf frischen phosphatfreien Boden übergeimpft, ist noch zur Gährung im Stande und auf phosphathaltendem Boden wird sofort wieder Volutin gebildet. Einmal ist bei diesen Versuchen in einer Torula monosa-Kultur auf phosphatfreiem Boden eine Pigmentbildung

in der Hefezelle aufgetreten, macroscopisch als dunkelgraue Verfärbung, microscopisch an der Gegenwart von braunen Pigmentkörnchen erkennbar, welche Pigmentbildung in phosphathaltigem Medium aufhörte, ohne Phosphatzusatz aber wiederkehrte.

ZUSAMMENFASSUNG DER RESULTATE.

Die Bildung des Volutins in Pilz- und Hefezellen ist an die Anwesenheit einer anorganischen oder organischen Phosphorverbindung im Nährboden gebunden. Auf phosphatfreiem Boden können Ustilago maydis, Torula monosa, Lactosehefe und Saccharomyces cerevisiae kultiviert werden, ohne dass Volutin in der Zelle entsteht. Bei der Ueberimpfung auf phosphathaltenden Boden findet sofort Neubildung des Volutins statt.

Mit verdünntem Alkali wird gleichzeitig mit dem Volutin eine Nucleinsäureverbindung ausgezogen, welche nicht aus einer übereinstimmenden Menge einer volutinfreien Kultur zu erhalten ist. Die schon in indirekter Weise verteidigte Hypothese, dass Volutin eine Nucleinsäureverbindung sei, hat hiermit ihre endgültige Bestätigung erlangt. Nucleinsäure nach der bekannten Bereitungsweise aus Handelshefe erhalten, muss hauptsächlich aus dem Volutin herstammen. Die aus der volutinhaltenden Zelle gelöste Nucleinsäureverbindung wird von einer Nuclease zersetzt, welche in der Torulazelle selbst gebildet wird, bei welcher Zersetzung Phosphorsaüre frei kommt. Auch die volutinfreie Torulakultur enthält eine Nuclease. Ebenfalls andere Enzymwirkungen nämlich die Zymase- und Katalasewirkung bleiben in der volutinfreien Zelle fortbestehen. In Gegensatz zu der neulich von HENNEBERG verteidigten Meinung, das die Zymasebildung der Hefe an die Gegenwart des Volutins gebunden sei, diese letztere Substanz vielleicht sogar als das Enzym selbst zu betrachten sei — konnte nachgewiesen worden, dass volutinfreie Kulturen noch eine deutliche Gährung hervorrufen.

Volutin ist also eine Nucleinsaüreverbindung, welcher vermutlich keine andere Rolle als die einer Reservesubstanz zukommt. Die Gegenwart dieser Substanz — möge sie dem Leben und der Fortpflanzung nicht unentbehrlich sein — ist ohne Zweifel von Bedeutung für den individuellen Wert der Zelle.

Es wäre ja möglich, dass sie — wenn auch nichts für die Gährung notwendig — den Gährungprozess erleichtert durch die fortdauernde Lieferung kleiner Phosphatmengen, welche durch die Nuclease aus der Nucleinsaüre im Zellkörper selbst zu erhalten sind.

[Travail du Laboratoire du professeur Spronck et du laboratoire central d'hygiène publique à Utrecht].

CONTRÔLE D'UN VACCIN ANTITYPHIQUE.

PAR

le Dr. H. ALDERSHOFF.

Dans les Folia microbiologica du mois d'août 1915 (IVe année, Ière fasc.) GORTER et TEN BOKKEL HUININK ont indiqué une méthode qui permettrait d'établir pour l'homme la puissance immunisatrice d'un vaccin antityphique, méthode basée sur le degré d'immunité que ce vaccin donne à un cobaye ayant reçu en injection une dose de bacilles typhiques mortelle pour l'animal non vacciné.

Leur conclusion est,, que leur méthode de contrôler un vaccin antityphique d'après les résultats d'immunisation qu'on constate chez les cobayes donne des certitudes qu'aucune autre méthode ne saurais donner.

Si l'on peut souscrire à cette conclusion c'est pourtant pour des raisons en réalité négatives, aucune autre méthode n'ayant donné des résultats satisfaisant dans le pratique. Les circonstances ne permettront pas, le plus souvent de faire entre de grands groupes de personnes vaccinées et non vaccinées des comparaisons auxquelles on pourrait se fier; aussi, les statistiques ne sauraient donner des certitudes sur la valeur de tel ou tel vaccin.

Un examen de la teneur en substances immunisatrices du sérum des personnes vaccinées — si l'on admet toutefois que

cela peut nous fournir des données exactes sur l'immunité — a pour résultat de nous ne faire connaître la nature du vaccin qu' après la vaccination. Cette méthode n'est donc pas sans valeur pour une série de nouvelles vaccinations.

Dans la seconde partie de leur conclusion, G. et TEN B. H. disent qu'il leur semble souhaitable qu'une application à l'homme d'un vaccin antityphique soit précédée d'un contrôle de sa valeur dans une expérience sur le cobaye. Ce désir est plausible si l'on admet que, de l'expérience sur les cobayes on peut tirer des conclusions pour l'homme. Mais les auteurs eux-mêmes l'ont déjà dit ; leur méthode a le seul défaut de supposer que l'homme et le cobaye réagiront d'une manière tout à fait identique à la vaccination. Ce »seul« défaut en devient un très grand, si l'on considère que leurs manières de réagir sont tout à fait différentes et qu'il n'est pas du tout impossible qu cette réaction différente mette en mouvement, pour former des matières immunisatrices, un tout autre mécanisme qui amènerait une tout autre espèce d'immunité.

Ce n'est pas mon but de traiter ici toutes les considérations théoriques auxquelles la question pourrait donner lieu.

J'ai seulement voulu profiter de l'occasion qui m'a été offerte pour vérifier, par des expériences sur l'homme, si un vaccin qui immunise un cobaye contre une dose mortelle de bacilles typhiques qu'elle a reçue en injection intrapéritonéale, peut donner de meilleurs résultats qu'un vaccin peu ou pas capable d'amener l'immunisation de cet animal. Ce que j'ai donc voulu faire, c'est de contrôler l'ingénieuse méthode de G. et TEN B. H. par les résultats pratiques. De quelle manière doit on juger les résultats de la vaccination chez l'homme et chez l'animal? De quelle mesure doit on se servir pour déterminer le degré d'immunité? Il n'y a pas de mesure absolue. On se tire d'affaire, tant bien que mal, en déterminant la teneur en substances agglutinantes, bactéricides, opsonisantes et fixatrices de complément qui se trouve dans le sérum; nous n'avons pas de preuves que la quantité de ces substances soit une bonne mesure pour l'immunité, bien qu'on en reconnaisse la probabilité.

Je n'ai pas examiné, puisque le travail est peu commode et demande beaucoup de temps, le sérum des sujets vaccinés quant à la présence d'opsonines et à la puissance fixatrice de

complément; je me suis restreint à en déterminer la puissance agglutinante et bactéricide, expériences que j'ai pu faire dans le laboratoire central d'hygiène publique.

J'ai fait l'épreuve d'agglutination d'après la méthode microscopique en broyant la culture virulente dans le sérum délagé; après que le tout a été pendant deux heures exposé à 37°, j'ai constaté quel était le résultat après 24 heures.

Pour déterminer la puissance bactéricide, j'ai suivi la méthode de ARDIN-DELTEIL, NÈGRE et RAYNAUD (Ann. de l'Int. Pasteur 1913, nº. 8) qui revient à ce qui suit:

Le sérum à examiner est inactivé pendant 30 minutes à 56°; puis on y ajoute du bouillon de culture typhique âgée de 24 heures (1 sérum: 10 culture) et une quantité de sérum de cobaye (c. q. d'homme) égale à la quantité de sérum qui doit être examiné. Ce mélange reste pendant 24 hs exposé à une température de chambre; puis on en prend 1 öse qu'on met dans 10 cc. de bouillon; de ce bouillon on vaccine dix autres cc. de bouillon, de 3 gouttes; 6 gouttes de ce dernier bouillon sont mis dans de l'agar fondu, dont on fait des plaques. Après 24 heures de 37° on compte le nombre de colonies qui s'est développé sur les plaques et pour rendre une comparaison possible on prend tous les chiffres en proportion de 100 colonies de bacilles typhiques de la plaque de contrôle, qui ne content que complément et culture dans la même proportion (1 : 10). J'ai légèrement modifié cette manière d'agir, en me servant comme contrôle d'un mélange de sérum normal de cobaye ou d'homme inactivé, complément et culture, ce qui permettait aux influences de substances immunisatrices éventuellement présentes dans le sérum normal dans les ampoules d'épreuves et celles de contrôle, de se neutraliser.

Cette méthode est plus simple que celle de NEISSER et WECHSBERG que j'ai suivie autrefois (Vois: Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1915. 1ère moitié nº. 12) et m'a donné d'aussi bons résultats.

Pour arriver au but que je m'étais proposé, je devais avoir à ma disposition:

1º. Une culture de bacilles typhiques, suffisamment virulente pour des cobayes.

2º. Un vaccin donnant aux cobayes un haut degré d'immunité contre des bacilles typhiques.

3°. Un vaccin qui ne protège pas ou peu les cobayes contre les suites d'une injection intrapéritonéale de bacilles typhiques virulentes.

4°. Un certain nombre de personnes, vaccinés avec les vaccins nommés sub. 1 et sub. 2., suffisant pour permettre une comparaison.

Sub. 1°. Avec une grande bienveillance M.M. G. et TEN B. H. ont mis à ma disposition la culture de bacilles typhiques dont ils se sont servis dans leurs expériences. Seulement, puisque dans leur communication on ne trouve pas indiquée la dose minima mortelle de cette culture L., il ne m'était par possible de constater si la virulence, augmentée par eux d'après la méthode des pochettes de collodion, avait diminué. Peut-être cela a été, en effet, le cas; ou bien, le sort m'a été bien favorable. En tout cas, sans avoir pris des mesures particulières, j'eus à ma disposition une culture typhique (Mrt) dont la dose minima mortelle (mortelle dans 24 heures) se portait à 0,04 de culture de gélose pour un cobaye de 300 gr.; 0,05 L. avait le même effet. Il résulte de la communication de G. et TEN B. H. que 0,1 L. tuait un cobaye de 300 gr. en 20 heures; 0,02 L. en 72 heures. Sans doute la virulence n'a donc pas pu diminuer sensiblement; ma culture Mrt. était donc une heureuse trouvaille, surtout quand on considère les peines que G. et TEN B. H. ont eues pour augmenter la virulence de leur culture L.

Cette culture Mrt. provenant de la rate d'un typhoïque, mêleé à trois autres cultures, sert à la préparation du vaccin antityphique SPRONCK, qui en grande quantité a été appliqué à la vaccination de nos soldats. J'ai déterminé également le d. m. m. de ces trois cultures: elle était pour la culture Févr. (rate d'un typhoïque) 0,07; pour la culture Déc. (rate d'uu typhoïque) 0,08 et pour la culture C. L. (provenant du laboratoire central) 0.09. Le grand nombre de cobayes nécessaires à ces expériences fut mis à ma disposition par la bienveillance du professeur SPRONCK.

Sub. 2° et 3°. Je me suis servi de quatre vaccins différents: le vaccin L. préparé par G. et TEN B. H. de leur culture; le vaccin Mrt., le vaccin C. L. et le vaccin polyvalent SPRONCK, tous préparés par la baronne Dr. DE NEGRI; les vaccins contenaient tous 1000 millions de bacilles par c. c. étaient tous

préparés de la même manière de culture de gélose, tuée à 54° C. en ajoutant ½ % de phénol.

Pour suivre autant que possible la méthode de G. et TEN B. H. j'ai appliqué dans la plupart des cas les doses indiquées par eux; cependant j'ai cru faire une exception pour les grandes doses (p. e. 1000 millions de bacilles par K.G. cobaye) comme s'écartant trop de la quantité appliqué ordinairement à l'homme; j'ai pris 100 millions de bacilles par cobaye de 300 gr.; 250 millions pour une seconde vaccination.

Autant que possible un mois après la vaccination, j'ai examiné le degré d'immunité par une injection intrapéritonéale d'un multiple de la d. m. m., ce à quoi j'avais fais précéder la détermination de la puissance agglutinante et bactéricide du sérum, obtenu par ponction du coeur, qui m'a fait rarement perdre un animal.

Bien que la question de savoir, si le vaccin préparé de bacilles typhiques virulentes immunise en règle générale mieux que celui préparé de bacilles avirulentes, ne soit pas encore décidée du tout (RUSSELL p. e. se sert d'un vaccin préparé d'une culture peu virulente) il me semblait tout de même naturel d'examiner en premier lieu la proportion du vaccin Mrt. (culture d. m. m. 0.04) et du vaccin C. L. (culture d. m. m. 0.09). Puisque, en outre, pour l'application à l'homme, la valeur d'un vaccin n'est pas seulement déterminée par la puissance immunisatrice contre telle ou telle culture typhique, mais plutôt par la puissance immunisatrice générale contre la typhoïde, je n'ai pas seulement examiné la puissance protectrice par rapport à la culture dont le vaccin en question avait été préparé, mais aussi par rapport à d'autres cultures.

Il faudrait un très grand nombre d'animaux d'expérience pour pouvoir aboutir à des documents tout à fait probants. Mes expériences ne prétendent pas à ce résultat général; elles donnent seulement des indications.

Vaccin Mrt. 23 X '15. Une injection sous la peau de 100 millions de bacilles.

300 gr.	cavia	*a*	18 XI	agg.	$^1/_{250}$	puiss.	bact.	$^{100}/_{8}$	22 XI	5 × d. m. m. Mrt.
300 »	»	*b*	18 XI	»	$^1/_{1000}$	»	»	$^{100}/_{16}$	22 XI	5 × d. m. m. L.
300 »	»	*c*	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{25}$	22 XI	5 × d. m. m. fév. + 36 hs.
300 »	»	*d*	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{14}$	22 XI	5 × d. m, m. déc.
300 »	»	*e*	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{28}$	22 XI	5 × d. m. m. C. L.

Une injection sous la peau de 100 mill. de bacilles 28 XI.

cobaye c^1 24 XII aggl. $^1/_{250}$, puiss. bact. $^{100}/_{18}$ 29 XII 3 × d. m. m. févr. + 24 hs.

Deux vaccinations: 28 XI 100 mill. 5 XII 250 mill. de bacilles.

cobaye c^2 3 I '16 aggl. $^1/_{500}$, puiss. bact. $^{100}/_{8}$, 6 I '16 3 × d. m. m. févr. + 48 hs.
» c^3 3 I '16 » $^1/_{1000}$, » » $^{100}/_{14}$, 6 I '16 5 × d. m. m. févr. + 72 hs.

Conclusion: Le vaccin *Mrt.* amène l'immunité après une vaccination contre 5 × d. m. m. des cultures *Mrt.* L. *déc.* et C. L.; contre 3 × d. m. m. de la culture *févr.* elle n'immunise pas, même après 2 vaccinations.

Vaccin C. L.

23 X '15. Une vaccination de 100 millions de bacilles.

cobaye A 18 XI aggl. $^1/_{500}$ puiss. bact. $^{100}/_{10}$ 22 XI 5 × d. m. m. *mrt.* + 24 hs.
» B 18 XI » $^1/_{250}$ » » $^{100}/_{12}$ 22 XI 5 × d. m. m. L. + 36 hs.
» C 18 XI » $^1/_{250}$ » » $^{100}/_{19}$ 22 XI 5 × d. m. m. févr. + 20 hs.
» D 18 XI » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{13}$ 22 XI 5 × d. m. m. déc. + 24 hs.
» E 18 XI » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{26}$ 22 XI 5 × d. m. m. C. L. + 60 hs.

28 XI. Une vaccination de 100 millions de bacilles.

cobaye A^1 24 XII aggl. $^1/_{500}$ puiss. bact. $^{100}/_{15}$ 29 XII 3 × d. m. m. *mrt.* + 48 hs.
» B^1 24 XII » $^1/_{250}$ » » $^{100}/_{36}$ 29 XII 3 × d. m. m. L.
» C^1 24 XII » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{20}$ 29 XII 3 × d. m. m. *févr.* + 72 hs.
» D^1 24 XII » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{17}$ 29 XII 3 × d. m. m. *déc.* + 48 hs.
» E^1 24 XII » $^1/_{250}$ » 1 $^{100}/_{21}$ 29 XII 3 × d. m. m. C. L.

28 XI. Deux vaccinations 100 millions; 5 XII 250 millions.

cobaye A^2 3 I '16 aggl. $^1/_{500}$ puiss. bact. $^{100}/_{6}$ 6 I '16 3 × d. m. m. + 36 hs.
» B^2 3 I '16 » $^1/_{1000}$ » » $^{100}/_{11}$ 6 I '16 5 × d. m. m. L (contrôle)
» C^2 3 I '16 » $^1/_{1000}$ » » $^{100}/_{16}$ 6 I '16 3 × d. m. m. *févr.*
» D^2 3 I '16 » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{14}$ 6 I '16 3 × d. m. m. *déc.*
» E^2 3 I '16 » $^1/_{500}$ » » $^{100}/_{9}$ 6 I '16 5 × d. m. m. C.L. (contr.)

Conclusion: Le vaccin C. L. n'immunise après une vaccination contre aucune des cultures prises en 5 × d. m. m.; contre les cultures L. et C. L. seulement en 3 × d. m. m.

Après deux vaccinations elle immunise contre toutes les cultures (excepté *Mrt.*; aussi contre *févr.*) en 3 × d. m. m.

Après les expériences surmentionnées je disposais donc d'un

vaccin qui immunise bien les cobayes et d'un autre qui les immunise peu; en outre, j'avais encore le vaccin L. préparé par G. et TEN B. H. de leur culture L. avant que la virulence en fût augmentée d'après le méthode des pochettes de collodion; c'était donc un vaccin semblable à C. L. préparé de bacilles peu virulentes, ce qui n'empêchait pas que la puissance protectrice en parût très grande dans les expériences. J'insiste sur ce fait, parce qu'il serait si facile d'arriver à la conclusion, logique en apparence, que les cultures avirulentes produiraient des vaccins peu puissants.

Comme j'avais déjà vacciné des milliers de soldats avec le vaccin SPRONCK et que je disposais de données sérologiques de beaucoup de vaccinés, la question de savoir, de quelle manière les cobayes réagiraient après vaccination avec ce vaccin quadruple, m'intéressait beaucoup.

Vaccin Spronck.

23 X '15. Une vaccination de 100 millions de bacilles.

cavia	α	18 XI	aggl.	$^1/_{1000}$	puiss.	bact.	$^{100}/_{31}$	22 XI	5 ×	d.	m.	m.	*mrt.*	+ 24 hs.
»	β	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{27}$	22 XI	5 ×	d.	m.	m.	L.	+ 48 hs.
»	γ	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{15}$	22 XI	5 ×	d.	m.	m.	*févr.*	
»	δ	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{16}$	22 XI	5 ×	d.	m.	m.	*déc.*	+ 60 hs.
»	ε	18 XI	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{10}$	22 XI	5 ×	d.	m.	m.	C. L.	

28 XI. Une vaccination de 100 millions de bacilles.

cavia	α^1	24 XII	aggl.	$^1/_{250}$	pniss.	bact.	$^{100}/_{43}$	29 XII	3 ×	d.	m.	m.	*mrt.*	+ 30 hs.
»	β^1	24 XII	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{27}$	29 XII	3 ×	d.	m.	m.	L.	+ 30 hs.
»	γ^1	24 XII	»	$^1/_{500}$	»	»	$^{100}/_{17}$	29 XII	5 ×	d.	m.	m.	*févr.* (contrôle).	
»	δ^1	24 XII	»	$^1/_{1000}$	»	»	$^{100}/_{13}$	29 XII	3 ×	d.	m.	m.	*déc.*	

28 XI. Deux vaccinations 100 millions. 5 XII 250 millions.

cavia	α^2	3 I '16	aggl.	$^1/_{500}$	puiss.	bact.	$^{100}/_{18}$	6 I '16	3 ×	d.	m.	m.	*mrt.*
»	β^2	3 I '16	»	$^1/_{1000}$	»	»	$^{100}/_{23}$	6 I '16	3 ×	d.	m.	m.	L.

Conclusion: Le vaccin SPRONCK immunise après une vaccination contre 5 × d. m. m. des cultures *févr.* et C. L., contre 3 × d. m. m. de la culture *déc.;* après deux vaccinations encore contre 3 × d. m. m des culturer *mrt.* et L. Comme prophylactique contre la contagion typhique des cobayes avec différentes cultures, ce vaccin polyvalent a donc le plus de valeur.

Sans prendre en considération les expériences que j'ai faites sur l'homme, afin de contrôler la méthode de G. et TEN B. H., il résulte déjà des expériences faites sur l'animal, que cette méthode ne saurait donner des résultats pratiques.

Supposons que nous nous serions servi du vaccin *mrt.*, destiné à la vaccination de l'homme, pour le traitement, d'après leur méthode, d'un cobaye, qui aurait subi une injection de la culture *févr.*, force aurait été d'en conclure à son inefficacité pour la vaccination de l'homme. En revanche, le fait que les animaux ayant subi une injection des cultures mrt., L., déc. et C. L. ne meurent pas, aurait amené la conclusion contraire.

Pour ce qui est du vaccin SPRONCK, au contraire, il risque de donner des résultats négatifs après une seule expérience, dans 3 des 5 cas, tandis que les expériences continuées nous démontrent clairement qu'il immunise contre 5 cultures, injectées par doses telles qu'il ne s'en présenterait guère dans la contagion humaine. Bref, prouver qu'un vaccin quelconque immunise un cobaye contre les suites d'une injection de bacilles typhiques en forte dose, ce n'est pas prouver qu'il immunise contre d'autres cultures typhiques; plus il entrera de cultures différentes dans la prèparation d'un vaccin, plus il sera efficace. *Ceci prouve le bon droit des vaccins polyvalents.*

G. et TEN B. H. ont joui dans leurs expériences des circonstances les plus favorables pour constater la puissance immunisatrice très grande de leur vaccin: leurs cobayes, en effet, avaient été infectés plus tard de bacilles provenant de la même culture que leur vaccin; c'était au fond un autovaccin. S'ils avaient pu disposer d'un homme qui aurait consenti à se faire infecter après par la culture L., leur vaccin n'aurait sans doute pas failli, et aurait prouvé l'efficacité apparente de leur contrôle de vaccin sur le cobaye. La façon dont ils ont fait leurs expériences ne saurait donc pas justifier leur désir de contrôler de la même manière tout autre vaccin avant son application à l'homme. A quel point leur principe peut avoir de valeur, devra être démontré par des recherches étendues dont l'essentiel serait que l'animal subirait une injection composée d'autant de cultures possibles. En théorie ce n'est pas impossible; mais la méthode n'aura plus guère de valeur pratique. Et toujours, on n'aura pas encore décidé de la question de savoir, si un vaccin

qui immunise le cobaye contre beaucoup de cultures, fera naître chez l'homme une plus grande quantité de substances immunisatrices que le vaccin qui a failli dans l'expérience sur le cobaye.

Sub. 4°. Les expériences pour comparer les résultats donnés par les quatre vaccins, après vaccination chez l'homme, peuvent donner une réponse à cette question.

J'ai choisi pour ces expériences 4 groupes de 25 personnes, vivant dans les mêmes circonstances; chaque personne a été vacciné 3 fois, de la manière ordinaire de nos soldats, c. à d. avec une semaine d'intervalle entre deux vaccinations successives; dose: 500—1000—1500 millions de bacilles.

Quatre semaines après la vaccination, au bout desquelles comme je l'ai démontré ailleurs (Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1916, 2de moitié n°. 4) on peut constater les puissances agglutinantes et bactéricides chez presque tous les vaccinés, j'ai déterminé pour toutes les cent personnes la puissance agglutinante et pour quarante seulement la puissance bactéricide du sérum. Le tableau suivant donne les résultats de cette expérience:

Vaccin.	Mrt.	L.	C. L.	SPRONCK.
moyenne titre aggl. de 25 personnes.....	$^{1}/_{246}$	$^{1}/_{252}$	$^{1}/_{245}$	$^{1}/_{316}$
» puiss. bact. » 10 »	$^{100}/_{34}$	$^{100}/_{28}$	$^{100}/_{23}$	$^{100}/_{19}$

Il en résulte que, d'après la puissance bactéricide du sérum, à laquelle il faut attacher une plus grande importance qu'à la puissance agglutinante, l'immunité des personnes vaccinées avec le vaccin SPRONCK, qui donne aussi les meilleurs résultats dans les expériences sur le cobaye, est la plus grande.

Entre paranthèses, je voudrais faire observer que la puissance agglutinante de ces vaccinés était également la plus grande, parallélisme que j'ai pu constater bien souvent chez l'homme, mais qui dans les expériences sur l'animal est moins évident. Le vaccin C. L. qui, après le vaccin SPRONCK amenait la plus grande puissance bactéricide, aurait dû ne pas se comporter ainsi d'après les expériences sur l'animal, tandis qu'on aurait attender mieux, d'après ces mêmes expériences, des vaccins *Mrt.* et L.

Conclusion : Les vaccins qui immunisent les cobayes contre les conséquences d'une injection de bacilles typhiques, ne garantissent pas, après application chez l'homme, la formation d'une grande teneur en substances immunisatrices ; pour cette raison encore il n'est pas possible de croire à l'utilité de la méthode G. et TEN B. H., pour la pratique du contrôle de vaccins.

KAPSELBILDUNG BEI DEXTRANLAKTOCOCCEN

VON

JAN SMIT. [1])

Im Jahre 1912 hat BEYERINCK [2]) zuerst die Natur des sogenannten Froschlaichpilzes (Leuconostoc oder Streptococcus mesenterioïdes, VAN TIEGHEM) richtig erkannt, und ihn unter dem Namen *Lactococcus (streptococcus) dextranicus* in die Gruppe der aktiven Milchsäurefermenten eingereiht. Eine genaue Beschreibung dieses Schädlings der Zuckerfabriken findet man, ausser in Beyerinck's Aufsatz, auch in der mit schönen Photographien versehenen Beschreibung ZETTNOW's. [3]). Dass man diese Bakterienart nicht in den Zuckerfabriken zu suchen braucht, (wie Zettnow und andere taten) sondern dass man ihn vielmehr in unserer nächsten Umgebung ohne Mühe auffinden kann, ist eines der interessantesten Resultate von Beyerinck's Arbeit. Der von ihm beschriebene Anhäufungsversuch [4]) gelingt, wie ich öfters zu konstatieren die Gelegenheit hatte, mit jedem beliebigen Siel- oder Grabenwasser und auch mit Gartenerde und führt unmittelbar zu einer kräftigen Kultur, aus der man, durch einmaligen Ausstrich auf Hefenwassergelatine mit 10—20 % Rohrzucker, eine Reinkultur bekommen kann. Ich habe diesen Versuch zu wiederholten Malen gemacht, und immer dasselbe Resultat erhalten: der Inhalt der mit dem Sielwasser

---

[1]) Nach einem Vertrag gehalten in der Versammlung der »Nederlandsche Microbiologische Vereeniging« am 2ten December 1916 zu Leiden.

[2]) Diese Zeitschrift 1.377 (1912).

[3]) Z. für Hygiene 57.154 (1907).

[4]) l. c. p. 396.

geïmpften Flasche wird nach 2 bis 3 Tagen bei 20° volkommen trübe und schleimig, und die damit angefertigten Gelatineplatten zeigen ein üppiges Wachstum von wasserhellen, hoch aufliegenden Kolonien des Lactoc.dextranicus. Zu betonen ist aber, dass das so erhaltene Wachstumsbild nur sehr wenig Ähnlichkeit hat mit dem, welches die durch dem Froschlaichpilz befallenen Zuckersaftleitungen der Zuckerfabriken aufweisen: hier die festen Froschlaichklumpen, dort das weiche Dextranschleim, worin man unter dem Mikroskop fast nur Diplo- und Streptococcen ohne Hüllenbildung beobachtet.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1°. Sind der Froschlaichpilz und die Dextrancoccen wirklich identisch?

2°. Kann man aus Naturmaterial auch den Froschlaichpilz erhalten und auf welche Weise?

3°. Gibt es Kulturbedingungen, wobei die zwei Formen in einander übergehen?

4°. Welches ist die Ursache, dass in den Zuckerfabriken der Froschlaichpilz, und in unseren Kulturen die Dextrankokken vorherrschen?

Beyerinck antwortet auf Frage 1 bejahend. Nach ihm bekommt man aus den Rohkulturen durch überimpfen auf Hefenwasser-Rohrzuckergelatineplatten mehrere Varietäten derselben Mikrobenart, die sich aber als erblich konstant erweisen, solange man die Kulturbedingungen unveränderd lässt. (l. c. p. 394 und 399). Unter diesen Varietäten nennt er auch den Leuconostoc. Nachprüfung dieser Ergebnisse lehrte mich Folgendes:

Die Streukultur auf Rohrzuckergelatine mit dem oben beschriebenen Rohmaterial ergibt ein üppiges Wachstum von Wasserhellen, fast durchsichtigen Dextrankolonien, welche allerdings bei Beobachtung mit schwacher Lupe nur aus hüllenlosen Dextrankokken zu bestehen scheinen, bei stärkerer Vergrösserung aber ohne Ausnahme mit einer gewissen, bald kleineren bald grösseren Zahl von Leuconostoc-Klümpchen gemischt sind. (Siehe Fig. 1) Ausserdem findet man ein einziges Mal ein oder zwei Stellen (unter mehreren Hunderten von Koloniën) wo sich eine Leuconostoc-Kolonie ziemlich rein ausgebildet hat. Indessen zeigt auch hier das mikroskopische

Bild zahllose nackte Dextrankokken neben den gekapselten Leuconostoc-zellen.

Versucht man aus einer solchen Kultur die beiden Formen rein zu züchten, so stöszt man auf unerwartete Schwierigkeiten. Es is mir kein einziges Mal gelungen ein Leuconostoc-Klümpchen von hartneckig anhängenden Kokken zu befreien, auch nicht, wenn ich sie in steriler Salzlösung und Zuckerlösung sorgfältig zerkleinerte, die Flüssigkeit abgoss, und diese Operation bis zu 20 Malen wiederholte. Die so gewaschenen Klümpchen zeigen, wenn vom Deckglas zerdrückt, noch immer dieselbe Infektion. Es kann daher nicht wundernehmen, das Weiterzüchtung eines solchen Klümpchens immer wieder eine gemischte Kultur ergibt, zumal die Kokken schneller zu wachsen scheinen als die Leuconostoc-zellen. Allerdings gelingt es in vereinzelten Fällen ein etwas besseres Resultat zu erhalten. Wenn nämlich die Streukultur eine verhältnismässig reine Leuconostockolonie ergeben hat, so liefert diese, wenn man die oben beschriebene Reinigung nachlässt, aber ohne Weiteres die Kolonie auf eine neue Platte ausstreicht, oftmals einen schönen »trockenen« Leuconostoc, worin man bei oberflächlicher Beobachtung keinen weichen Dextranschleim erblickt. Genauere mikroskopische Durchmusterung erweist aber immer das Gegenteil. Setzt man die Überimpfungen fort, so verschlimmert sich bald das Resultat: die weichen, schleimigen Kolonien der Dextrankokken drängen sich sehr bald in den Vordergrund, und alle Versuche, um die Sachlage zu verbessern, schlagen fehl. Es macht den Eindruck, als ob der Leuconostoc seine Vitalität je länger je mehr einbüsst.

Fängt man andererseits die Überimpfungen an mit Material aus einer weichen Dextrankolonie, so bleibt das Resultat ziemlich konstant. Die weichen Kolonien bleiben vorherrschen, enthalten aber, bei mikroskopischer Durchmusterung *immer* eine kleinere oder grössere Zahl von Leuconostoc-zellen, die oftmals zu Klümpchen vereinigt sind. Es leuchtet aber ein, dass auch hier das Impfmaterial wohl niemals ganz rein sein wird, wenigstens kann man dessen niemals ganz gewiss sein.

Es besteht also die Möglichkeit, aus jeder Rohkultur die beiden »Arten«: die Dextrankokken und den Leuconostoc, gewissermassen rein zu züchten, ohne dass es aber gelingt die eine

Form von der anderen gänzlich zu befreien. Wie weit man mit dieser Differenzierung kommen kann, zeigt Abb. 2. Besonders die Leuconostocform ist in einem (selten erhaltenen) reinen Stadium photographiert. ZETTNOW (l. c.) hat offenbar ein ganz ähnliches Resultat bekommen. Seine schönen Abbildungen zeigen deutlich, dass auch er die Leuconostocform nicht konstant zu erhalten gewusst hat (siehe Tafel I, Fig. 13 und Tafel III, Fig. 33).

Ich habe versucht, durch Abänderung der Kulturbedingungen, ein konstanteres Resultat zu erhalten, aber ohne Erfolg. Die geänderten Bedingungen betrafen:

1°. Temperatur: das Resultat änderte sich nicht zwischen 3°–35° C (oberhalb 23° C auf Agarplatten oder in flüssigen Kulturen).

2°. Konzentration des Rohrzuckers: Erhöhung von 1 bis 30 % Zucker gab keinen deutlichen Vorteil. Die besten Kulturen wurden mit 5—10 % Zucker erhalten.

3°. Konzentration der Gelatine: Die benutzte Hefenwassergelatine wurde mit Leitungswassergelatine verdünnt (1 : 5) und dazu 5 und 10 % Zucker hinzugefügt. Kein Resultat.

4. Alkalität des Nährbodens. Die gewöhnliche Hefenwassergelatine (1 Teil Presshefe, 4 Teile Wasser, 12 % Gelatine) ist schwach sauer (1—2 ccm. Normallauge pro 100 ccm. auf Phenolphtaleïn). Durchdie intensive Säurebildung dieser Bakterien kommt das Wachstum auf dieser Gelatine ziemlich bald zum Stillstand.

Alkalisiert man den Nährboden (7 ccm. Normallauge über dem Neutralpunkt pro Liter Gelatine) so wird wohl etwas mehr Dextran gebildet, aber der Schleim ist von einer viel weicheren, ja von oft fast flüssiger Beschaffenheit. Das weitaus beste Resultat erhält man durch Zugabe einer grossen Menge Kreide. Die oben besprochene Differenzierung in den zwei nahezu reinen Modifikationen, habe ich auf solchen Platten am erfolgreichsten durchführen können, nämlich so weit, dass (ohne Anwendung des Mikroskops) reine Kulturen der zwei Formen vorzuliegen schienen.

5. Anwendung flüssiger Nährböden. Impft man ein möglichst reines Stückchen »Leuconostoc« in ein Röhrchen mit Hefenwasser-Rohrzucker, so sinkt es an den Boden und entwickelt sich dort zu einem Leuconostoc-klumpen von 10 bis 20 facher Grösse, ehe die obenstehende Flüssigkeit merklich getrübt erscheint.

Meine Erwartung, dass überimpfen an diesem Zeitpunkt (oder Erneuerung der Nährlösung) einen reineren Leuconostoc ergeben müsse, hat sich nur zum Teil erfüllt. Zwar vermehrt sich der Leuconostoc-Bodensatz, aber die Dextrankokken vermehren sich zugleicherzeit, und, wie früher schon bemerkt, viel schneller. Überlässt man die Kultur zwei Tage sich selbst, so hört die Entwicklung des Leuconostoc ganz auf und die Flüssigkeit bekommt die schleimige Beschaffenheit einer Dextrankokkenkultur.

6. Luftzutritt. Dieser hat für unsere Frage keine entscheidende Bedeutung. Auf Gelatineplatten sowohl, als auch in ganz verschlossenen Flaschen sind beide Formen möglich und die Stabilität der Leuconostocform wird durch anaërobe Kultur nicht beeinflusst. Das Wachstum des Str. dextranicus im Stich zeigt ein eigentümliches Bild. Vom Stichkanal aus wachsen linsenförmige Kolonien von Dextrankokken in die Gelatine ein. Das Bild ändert sich in der Tiefe nicht. ZETTNOW (l. c.) gibt Abbildungen von Stichkulturen einiger seiner Leuconostoc-stämme. Diese zeigen im ganzen Stich das Leuconostocbild, so lange die Kultur jung ist. In älteren Stadien sieht man aber die Entwicklung linsenförmiger Ausläufer, gerade so wie in der Stichkultur von Str. dextranicus (man siehe seine Figur 41 und 42 auf Tafel IV). Auch bei ZETTNOW hat also die Umbildung seiner Leuconostocform stattgefunden. In seiner Abhandlung wird aber diese Tatsache ausser acht gelassen.

Das Resultat aller oben genannten Versuche ist also, dass es unmöglich zu sein scheint, durch irgendwelche Abänderung der Kulturbedingungen die aus den Rohkulturen erhaltenen zwei Modificationen des *Lactoc. dextranicus* rein zu züchten. Die Frage nach der Identität derselben, welche die Koch'sche Plattenmethode nicht zu lösen vermochte, wird auch durch diese Kulturversuche nicht entgültig beantwortet. Zwar lassen die eindeutigen Resultate unter stark wechselnden Bedingungen vermuten, dass die Untrennbarkeit der beiden Formen durch die wechselseitige Umbildung derselben verursacht wird, aber absolute Gewissheit lässt sich auf diese Weise nicht gewinnen, da die nachweisliche Unreinheit des Impfmaterials jede Sicherheit ausschliesst.

Die einzige Kulturmethode, welche bessere Resultate versprach, war die Methode der Einzell-Kulturen. Die Arbeitsweise

SCHOUTEN's [1]), nach welcher eine Zelle der betreffenden Kultur mit Hilfe feinster Glasnadeln unter dem Mikroskop isoliert wird, schien für meinen Zweck die geeignetste. Aus der freundlichen Mitwirkung des Herrn Dr. SCHOUTEN sind unterstehende Resultate hervorgegangen. Dieselben sollen hier erörtert werden nur insofern sie der Frage der Identität von Leuconostoc und Dextrankokken angehören. Über andere interessante Ergebnisse dieses Studiums wird Dr. SCHOUTEN an anderer Stelle selber berichten.

Die Isolierung der Zellen geschah in den meisten Fällen aus einer flüssigen Kultur in Hefenwasser mit 10 % Rohrzucker. Wie schon früher gesagt, findet man darin, nebst einer überwältigenden Zahl von Dextrankokken, eine immerhin geringe Menge Leuconostoc-zellen. Es gelang nun ohne erhebliche Schwierigkeiten von beiden Formen einige reine Zellen herauszuholen, dieselben in sterile Tröpfchen derselben Nährflüssigkeit überzuführen und zum Wachstum zu bringen. Die isolierten Zellen wurden mit einer starken Immersionslinse beobachtet, und gänzlich frei von anhaftenden Bakterien befunden. Es ist bei dieser Methode ein leichtes, die Zellen ganz umzukehren, sodass auch die Unterseite auf Reinheit geprüft werden kann.

Bei der Entwicklung der isolierten Zellen ergab sich Folgendes. Die ersten Abkömmlinge der nackten Dextrancoccen (es wurden einige zwei- und einige mehrgliederige Exemplare isoliert) sind wiederum hüllenlose Bakterien. Während der ersten Stunden bleibt das mikroskopische Bild qualitativ unverändert, obwohl starke Vermehrung stattfindet. Nach 24 oder spätestens 48 Stunden beobachtet man aber neben diesen Coccen auch vereinzelt Leuconostoc-zellen, oft schon zu Klümpchen ausgewachsen. Nach 48 Stunden zeigt das Microskop immer dasselbe Bild: Dextrancoccen in groszem Übermass, und daneben einige Leuconostoc-Klumpen.

Auch die Entwicklung der isolierten Leuconostoc-zellen zeigt in dem Anfangsstadium das oben geschilderte Verhalten: die Tochterzellen sind ohne Ausnahme hüllenlos. Man sieht sie teils *in*, teils *ausserhalb* der Kapsel der Mutterzelle [2]). Nur die letz-

[1]) S. L. Schouten, Z. f. wissensch. Mikrosk. 22, 10 (1915). Verslagen Koninkl. Akademie Amsterdam 24 December 1910.

[2]) Die interressante Frage nach der Teilung der Leuconostoc-zellen wird in allen Einzelheiten von Dr. Schouten studiert werden.

teren vermehren sich, und zwar wie gewöhnliche Dextrancoccen, sodass nach 48 Stunden wiederum ein Gemenge beider Formen vorliegt. Indessen ist auch die ursprüngliche Leuconostoc-zelle zu einem groszen Klumpen ausgewachsen, auf welche Weise steht noch nicht ganz fest.

Das merkwürdige Resultat dieser Versuche ist also, dass die Dextrancoccen und die Leuconostoc-Zellen nach 48 Stunden *ganz genau* dasselbe Entwicklungsbild zeigen, und zwar ein Gemenge beider Formen, das höchstens in quantitativer Hinsicht für letzere ein wenig zu Gunsten der eigenen Form abweicht.

Die Einzellkultur hat also die Identität der beiden Formen ausser jeden Zweifel gestellt, und es lässt sich jetzt einsehen, dass das Fehlschlagen der Versuche zur Reinkultur des Leuconostoc nach der Koch'schen Methode in der oben beschriebenen Umbildung seine Ursache hatte.

Das Warum und Wie der Leuconostoc-bildung einerseits und der Produktion nackter Zellen andrerseits bleibt einstweilen unerklärt. Wie gern man auch die Gärungsprodukte und namentlich die Milchsäure dafür verantwortlich machen möchte, das oben geschilderte Resultat der Kultur auf Gelatineplatten mit viel Kreide lässt diesen Schluss nicht ohne Weiteres zu. Denn, die Nahrungsverhältnisse sind für beide Formen vollständig gleich, und der schädliche Einfluss der Säure ist bis auf ein Minimum reduziert, und dennoch erzielt man ohne Mühe eine Differenzierung, welche den Gedanken aufkommen lässt: der Leuconostoc sei eine von den Dextrancoccen verschiedene Mikrobenart. Andrerseits lässt sich doch auch manches sagen zur Unterstützung der Auffassung, dass die Stoffwechselprodukte bei dieser Erscheinung nicht ganz bedeutungslos sein können. Man darf nämlich behaupten, dass jede Ansammlung dieser Produkte von einer ziemlich schnellen Änderung der Kulturen in der Richtung der Dextrankokken begleitet wird. Oben wurde schon bemerkt, dass man aus frischen Naturmaterialen ziemlich leicht eine gute Kultur des Leuconostoc erhalten kann. Lässt man aber eine noch so gut gelungene Überimpfung in geschlossenen, vollen Flaschen auch nur wenige Tage stehen, so wird der Ausstrich auf Gelatineplatten schon sehr wenig oder gar keine Leuconostoc-kolonien mehr ergeben. Aber auch häufiges Ueberimpfen auf Platten oder in Flüssigkeiten genügt nicht, um den Leuconostoc

aufrecht zu erhalten. Ich habe oftmals die täglichen Erneuerungen so lange wie möglich fortgesetzt, aber bald verzögerte sich das Wachstum, so dass ich länger warten musste, ehe genügend Impfmaterial zu erhalten war, aber dann war der Leuconostoc schon durch die Kokken verdrungen. Vielleicht spielt hierbei auch der Luftzutritt seine Rolle. Immerhin war es von Interesse, die Erneuerung der Nahrung aufs Äusserste durchzuführen und damit den Einfluss der Stoffwechsel-produkte aufs Geringste zu reduzieren. Diese Kulturbedingung ist in den Zuckerfabriken ziemlich weitgehend realisiert, denn in den Saftleitungen fliesst ein kontinuer Saftstrom, der immer frische Nahrung herbeiführt für die an den Wandungen haftenden Bakterien. Die starken Froschlaichbildungen in diesen Leitungen scheinen darauf hin zu deuten, dass dieser Umstand für den Leuconostoc recht günstig ist. Ich konnte mich durch einen einfachen Versuch von der Richtigkeit dieser Anschauung überzeugen. Dazu nahm ich eine steriele Flasche mit doppeldurchbohrtem Kork. Durch die eine Bohrung ging ein Glasrohr bis auf den Boden, durch die andere ein umgebogenes Rohr, welches kurz unter dem Korken endete und mit dem andern Ende in einen Kolben hineinragte. Das erste Rohr war durch einen Schlauch verbunden mit einem grossen Scheidetrichter, welcher die sterilisierte Nährflüssigkeit, Hefenwasser mit 10 % Rohrzucker, enthielt, und aus welchem ein langsamer Strom dieser Lösung auf den Boden der Flasche geführt werden konnte, welcher durch das zweite Rohr wieder hinausfloss. Zuerst impfte ich die Lösung in der Flasche mit einem möglichst rein gewasschenen Stückchen Leuconostoc, und liess es während 18 Stunden wachsen. Nach dieser Zeit war eine ziemlich starke Vergrösserung desselben zu konstatieren, und jetzt wurde durch Öffnen von dem Hahne des Scheidetrichters der Saftstrom in die Flasche eingeführt. Letztere stand in einem Thermostaten von 25—27° C, während der Trichter ausserhalb blieb, und mit seinem Rohr den Kasten durchbohrte.

Nach weiteren 24 Stunden war eine sehr starke Vermehrung des Leuconostoc eingetreten, sodass die Flasche auf etwa ein Drittel mit dem bekannten Froschlaich gefüllt war. Die oben stehende Flüssigkeit war durch Dextrankokken stark getrübt. Es war etwa ein Liter der Nährlösung durch die Flasche passiert.

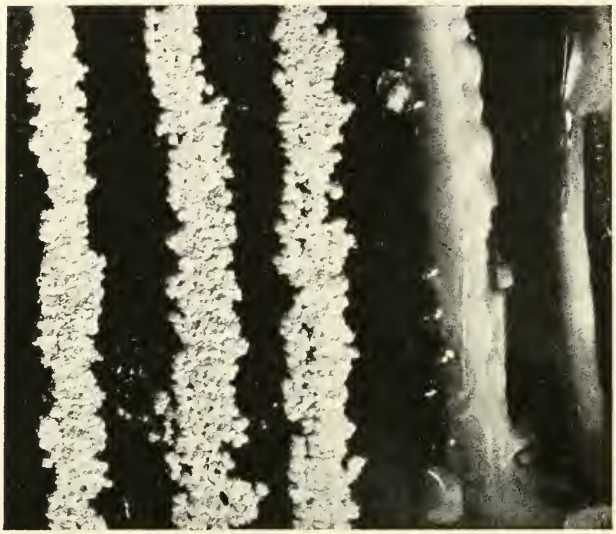


Fig. 2.

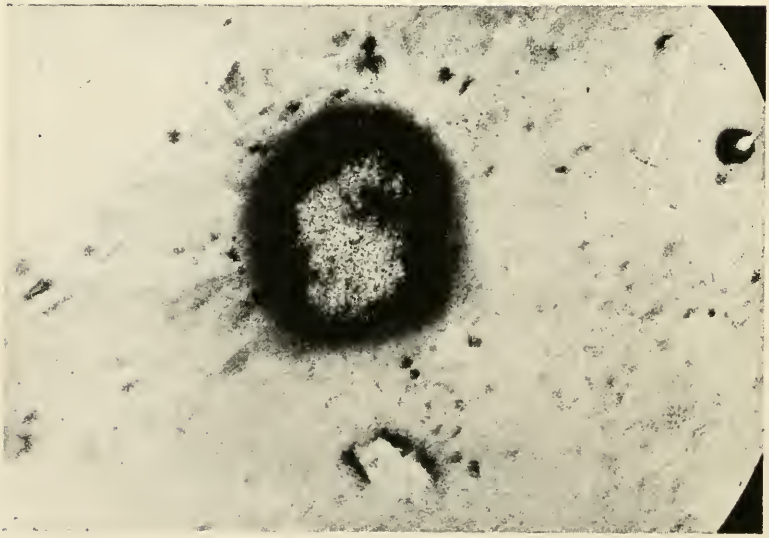


Fig. 1.

Dieser Versuch hatte also die Bedingungen der Zuckerfabriken ziemlich genau realisiert, und das Resultat war dementsprechend auch dasselbe. Impft man die Flüssigkeit mit einer Plattenkultur der Dextrankokken, so bekommt man, wie zu erwarten war, etwa dasselbe Wachstumsbild, aber nur etwas später, da die Produktion der Leuconostoczellen etwas später einsetzt. Die nahe Beziehung der beiden Formen wird durch diesen Versuch abermals hervorgehoben.

Es ist mir aber auch hier nicht gelungen den Leuconostoc rein zu bekommen. Ein schneller Saftstrom, welcher die schwere Leuconostocklumpen sozusagen wäscht, trübt sich nachher sehr schnell durch die Kokken.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde versucht die in der Litteratur nicht deutlich zutage getretene Beziehung zwischen den Leuconostoc mesenterioïdes (VAN TIEGHEM) und den Lactococcus dextranicus (BEYERINCK), klar zu legen.

Die Unzulänglichkeit der Koch'schen Methode zur Entscheidung der Frage nach der Identität dieser beiden Organismen wurde eingehend diskutiert, und dafür die Einzell-Kulturmethode empfohlen.

Es wurden die Versuche zur Reinzüchtung beider Organismen nach der Schouten'schen Einzell-methode beschrieben, und gezeigt, dass die beiden Formen in der Tat als zwei Modifikationen einer einzigen Mikrobenart aufzufassen sind, welche in einander überzugehen imstande sind. Der unwissenschaftliche Name Leuconostoc mesenterioïdes soll also als Artname aufgegeben werden.

Alle Versuche, eine der Modifikationen dauernd rein zu erhalten, schlugen fehl. Zumal die Leuconostocform zeigte sich sehr instabil und wandelte sich unter allen Umständen auf die Dauer fast vollständig in die Dextrancoccen um.

Die Kulturbedingungen welche in den Zuckerfabriken realisiert sind-dauernde Erneuerung der Nährflüssigkeit, erwiesen sich für die Leuco, nostocform am günstigsten.

A CASE OF NOCARDIASIS.

BY

A. PIJPER M. D. (Leyden). (*Bethal, Transvaal*).

Patient is a white man, 36 years of age, born in S. Africa. He complains of a chronic cough worrying him these last eleven years. Only in the early morning he produces sputum. There is no evidence of tuberculosis among his relations. He gets out of breath fairly soon and he cannot sleep on his left side because of a feeling of oppression overcoming him in that position. His weight and appetite are good. Treatment with various medicines brought no relief. Apparently there is no fever. On inspection a considerable degree of emphysema is found. The expiration is prolonged and the breath-sounds are harsh and loud. The physical signs are those of chronic bronchitis, moist rales are audible everywhere in varying intensity. The sputum is white-yellowish and mucopurulent. On microscopic examination it is found to consist of mucus, puscells, a few chromocytes, many cells from the lungs, and bacteria. The lungcells often present a peculiar appearence, being filled up with masses of bacteria, in the form of long and short bacilli, sometimes forming longer threads, occasionally with a swollen end, and sometimes broken up into coccuslike bodies. Similar gatherings are found outside the cells.

Attempts at culture (with all due precautions) were undertaken twice, and on both occasions a growth was obtained which could be recognised as belonging to the class of fungi which CASTELLANI (1) calls Nocardia, LEHMANN and NEUMANN (2) Actinomyces, and PETRUSCHKY (3) Trichomyceten. It proved pathogenic for guinea-pigs. Further characteristics are: on agar after 48—72 hours small whitish colonies become visible. These increase very slowly and become yellowish crusts, hard like cartilage, and very adherent to the medium. Their surface is

corrugated, sometimes in a regular way. (Fig. 1.) There often is a striking resemblance to actinomyces cultures.

Serum, and serumagar-cultures, resemble those on agar. Gelatine-cultures proved impossible, the fungus refusing to grow below 22°.

Broth remains clear, growth only takes place at te bottom.

Litmus milk is discoloured.

On potato occasionally a small whitish growth is obtained.

Anaerobic cultures never reach a great size.

SABOURAUD's media do not yield a growth.

The fungus is Gram-positive, not acid-fast, and non-motile.

Brothcultures under the microscope are seen to consist of long ramified unsegmented threads (thickness 0.2—0.3μ), with swollen ends and often containing granules. An enveloping membrane is not visible. All descriptions of fungi belonging to this and allied classes mention some sort of »granules«. Some authors believe they represent spores, others are of opinion they perform nuclear functions. Sometimes they are described as being situated within the threads, sometimes as leading a separate existence, or as passing from the one stage to the other through a process of fragmentation or segmentation. In this way they are sometimes regarded as biologically equivalent to the threads, sometimes as performing quite different functions. It is clear there exists no unanimity as regards the relation of »granules« and threads. This can be partly explained by the difficulty experienced in procuring microscopic preparations from the hard and very adherent cultures. A more delicate way of handling these is sure to give a more reliable insight into their structure. After hardening cultures with acetone and imbedding in paraffin, with a microtome thin sections may be obtained in every direction through the whole of the culture. A schematized drawing of a section through a fairly old culture, perpendicular to the surface of the medium shows fig. 2.

In the depths of the medium long wavy threads are visible. These account for the close adherence to the medium. They sometimes have swollen ends, and are often branching; segmentation is not visible. These threads contain granules, in an irregular distribution. These granules stain more readily and intensely with methylenblue than the threads, they are stronger

gram-positive, and with NEISSER's method they stain like BABES-ERNST's granules in diphteria-bacilli. They are beautifully brought into view by staining with KUHNE's crystalviolet solution, fixing with LUGOL's solution and decolourising with alcoholic eosin-solution. The granules show blue and the threads rosa.

The granules often are thicker than the mycelium. Where the threads pass out of the medium the number of granules increases, more so in old than in young cultures. In older cultures the whole thread often is taken up by granules. At the same time the threads become less visible and less distinct. In this way it happens that the oldest parts of a culture, and in old cultures practically the whole of the growth, seems to consist of granules. On closer examination however traces of the threads are discovered. We therefore come to the conclusion that the mycelium forms granules within the threads, and that after this the threads fade away. In carefully prepared sections isolated granules, coccuslike bodies or bacillarylike bodies are never to be seen. There is only a welldeveloped mycelium, which on becoming old dies off and leaves behind a mass of granules.

Now when from this sort of cultures smears are made in the usual way it necessary follows from the above considerations that a quite different picture must be seen. We now may see threads, granules in these threads, isolated coccuslike bodies, and by breaking up the mycelium, bacillary-like bodies.

As to the nature of the granules there can be little doubt. Even from cultures wherein the threads have faded away it is possible to obtain sub-cultures. When one studies these sub-cultures it is seen that the culture after 24 or 48 hours only contains „cocci" and very short threads. Later on longer threads occur and after a certain while granules begin to show themselves within the threads.

These are very strong arguments in favour of the theory that these granules are spores.

But if we accept this view then their way of origin forbids us to call them conidia or exospores. As they develop within the threads their name necessarily must be endospores or gonidia.

Nocardiae are supposed to belong to the class of Fungi Imperfecti, of which class the common characteristic is: repro-

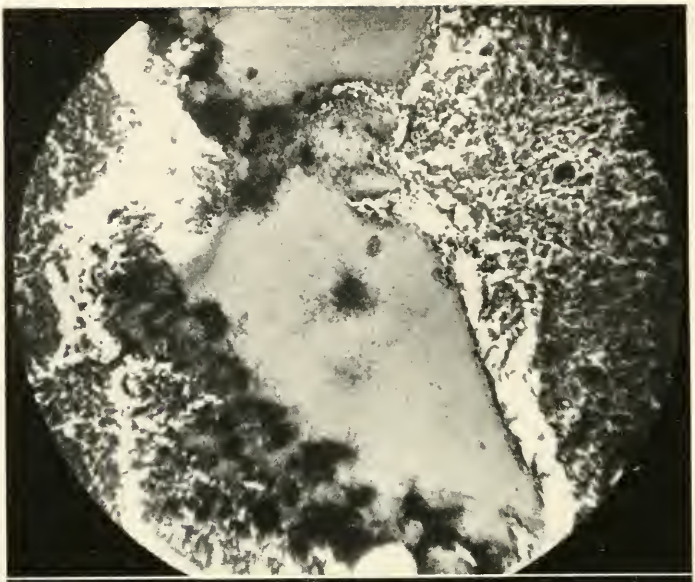


Fig. 3.

Fig. 2.

Fig. 1.

duction by exospores. If we therefore assume that the granules of Nocardiae are spores, and more especially endospores, we can no longer bring the Nocardiae under the Fungi Imperfecti. In this connection the drawing of fig. 2 has some interest. In the midst of the medium clusters of spores are visible. They are all contained in threads, but the formation is so closely arranged that the structure cannot be discovered in details. There certainly is a possibility that in these formations we may one day recognise a sporangium.

Pathogenicity. The pathogenicity of this fungus for guinea-pigs has been mentioned above. Injection of small quantities into the peritonial cavity of guinea-pigs prove fatal in about 14 days. On section a number of white nodular swellings is found in the peritoneum. The other organs are apparently normal. Microscopically (fig. 3) these nodules are seen to consist of an outer wall of epithelioid cells and leukocytes surrounding a cavity filled with fluid. In this fluid we find starshaped growths of the fungus, mostly in close connection with the epithelioid cells and often sending its branches between them.

Vaccine treatment. Attempts at vaccine treatment have been undertaken in similar affections. PETRUSCHKY (3) noted very successfull cases. In the case described here a vaccin was prepared from young cultures of the Nocardia on agar, killed by heat. After three injections patient reported that he produced less sputum, coughed less, and could sleep on both sides. Further injections brought no further improvement. Patient considers himself in a better condition than before, but not cured.

A second course of vaccination, this time comprising all bacteria that could be isolated from the sputum, had no effect at all.

References.

(1). CASTELLANI and CHALMERS. Manual of tropical medicine. 1913.

(2). LEHMANN and NEUMANN. Bakteriologische Diagnostik. 1912.

(3). PETRUSCHKY in Kolle und Wassermann's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. V.

Oeuvres complètes de CHRISTIAAN HUYGENS, publiées par la Société hollandaise des Sciences. Tome treizième (Fasc. I et II). **Dioptrique.** La Haye, MARTINUS NIJHOFF, 1916.

Les Directeurs de la Société hollandaise des Sciences ont eu la bienveillance de nous offrir les deux volumes de cette édition classique et monumentale, qui touchent à la science faisant l'objet de notre périodique.

En effet, HUYGENS, à l'aide des microscopes fabriqués par lui-même et dont il a élaboré en même temps la théorie physique, a pu faire des observations sur le terrain de la biologie, dont la description est fort intéressante du point de vue historique.

Or, ces observations qui datent depuis 1678, n'étaient pas toutes de vraies découvertes. C'était notre compatriote LEEUWENHOEK de Delft, dont les recherches microscopiques sur la circulation du sang, sur certains microbes etc. sont connues de ses lettres à la Société Royale de Londres depuis 1673. HUYGENS, en effet, a eu des relations personnelles avec LEEUWENHOEK, en il raconte que le mouvement du sang dans la queue d'une petite anguille lui a été montré par ce dernier. Ils ont étudié ce phenomène „avec délice" (summa cum voluptate).

En outre, HUYGENS a étudié l'aspect microscopique du lait, des spermatozoides ainsi que de l'eau, auquel il avait ajouté auparavant un peu de gingembre, de poivre ou d'une autre substance aromatique. BEIJERINCK et SWELLENGREBEL ont reconnu dans les figures dessinées par HUYGENS des bacilles, des infusoires, des flagellés et des spirilles. HUYGENS suppose qu'ils viennent de l'air et qu'ils sont attirées dans l'eau par l'odeur des dites substances aromatiques. Il constate d'ailleurs que »lorsque le vase est fermé, il n'en apparaît aucun." C'étaient donc des aérobies. M. BEYERINCK croit que HUYGENS, le premier, a vu les petits microbes comme les coliformes, qu'il aurait donc découvert.

Pour l'histoire de l'hygiène il est intéressant que l'auteur ajoute ici: »Or, ils planent aisément dans l'air à cause de leur extrême petitesse, attendu qu'ils sont beaucoup plus menus que les moindres grains de poussière. Il est donc fort possible que, sans le savoir, nous en faisions entrer dans nos poumons bien des milliers. Il ne serait pas inutile d'observer dans quels saisons il en apparaît davantage, et si leur nombre augmente lorsque l'air est vicié."

Le premier fascicule commence avec un „Avertissement" écrit par le Professeur D. J. KORTEWEG, le mathématicien de l'Université d'Amsterdam. Cette préface d'environ 150 pages est devenue uneétude profonde et fort remarquable de l'Oeuvre de HUYGENS sur la Dioptrique.

Le Journal „Folia Microbiologica" publie des articles originaux, principalement de microbiologistes hollandais, des revues générales et c. q. de la bibliographie, mais non pas des analyses d'autres journaux. Les articles d'étrangers ne sont pas exclus.

Les travaux paraissent en français, allemand ou anglais. Le journal publie e. a. le compterendu des séances de la Société Néerlandaise de Microbiologie.

Les auteurs reçoivent gratuitement 50 tirages de leurs articles.

Le Journal paraît en fascicules 2—3 fois par an. Le prix du volume d'environ 300 pages avec illustrations et registre, pour ceux qui ne sont pas membre ordinaire de la Société Néerlandaise de Microbiologie) est de fl. 12.— (frais de poste non compris).

Les articles que l'on désire publier dans les „Folia Microbiologica" peuvent être adressés à un des membres de la Rédaction.

The Journal „Folia Microbiologica" contains original articles, primarily by Dutch microbiologists; further general reviews, and eventually reviews of books, but no ordinary reference. Contributions from foreigners are not excluded.

The articles are published in English, French or German.

The Periodical publishes a. o. the transactions of the Dutch Microbiological Society.

Authors receive 50 copies of their articles gratuitously.

The Periodical appears serially, in 2—3 numbers a year, at irregular intervals. The subscription-fee for a volume of ± 20 sheets of printed matter, with illustrations and register is *f* 12.— (not post free).

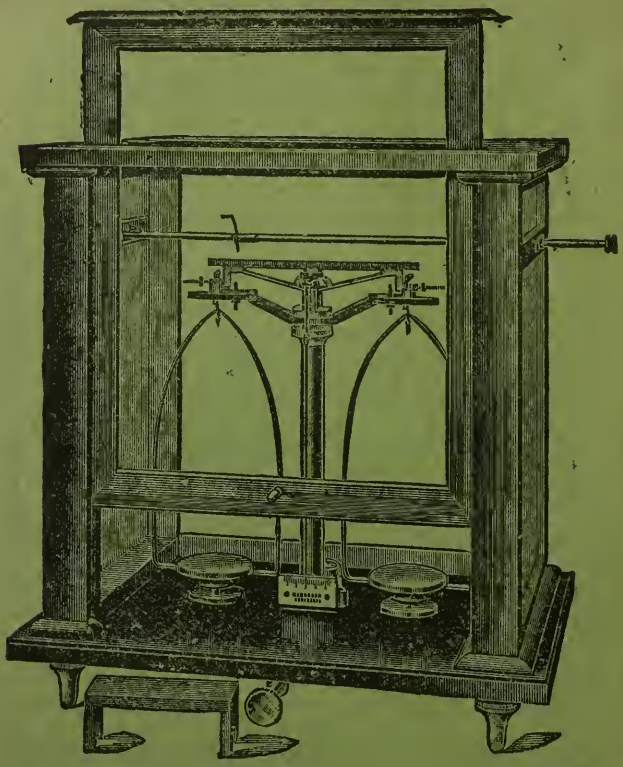
(For non ordinary members of the Dutch Microbiological Society).

Articles, to be published in the „Folia Microbiologica", may be sent to any of the editors.

BECKER'S SONS

BRUMMEN (GELDERLAND).

FILIAAL: VAN BRAKELSTRAAT 29a.



ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN- EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN VAN BESTUUR, ENZ. ENZ.

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHEIDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY

FOLIA MICROBIOLOGICA.

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT : VOOR MIKROBIOLOGIE. :

REDACTIE:

A. KLEIN, GRONINGEN.
J. POELS, ROTTERDAM.
J. G. SLEESWIJK, DELFT.

DEEL V, AFLEVERING 2. (NOVEMBER 1918).

REDACTIE EN ADMINISTRATIE:
PHOENIXSTRAAT 18, DELFT (HOLLAND).

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP
: VOORHEEN :
: J. C. TH. MARIUS :
GANZENMARKT 4-10, UTRECHT
SPECIALITEIT:
INRICHTING EN COMPLETEERING VAN WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA

MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN VAN CARL ZEISS TE JENA EN R. WINKEL TE GÖTTINGEN

MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN MICRO-PROJECTIE-APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN

INHOUD.

Pag.

D. A. DE JONG. Sur quelques caractères des bactéries dysentériques 55

H. C. JACOBSEN, Researches on and means to prevent rancidity of vegetable margarine 94

H. VAN STRAATEN en B. J. C. TE HENNEPE. Die Kleinsche Hühnerseuche 103

M. D. HORST. The influence of anorganic antimony-compounds on trypanosomes in the animal body . 126

Périodiques et livres reçus 141

Rectification 141

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica" veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u.A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Ärtikel kostenfrei.

Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 2—3 Mal Jährlich. Der Band von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Holländischen Vereinigung für Mikrobiologie) *f* 12.— (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica" sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

(Travail du Laboratoire de Pathologie comparée de Leyde).

SUR QUELQUES CARACTÈRES DES BACTÉRIES DYSENTÉRIQUES

PAR

le professeur Dr. D. A. DE JONG. 1)

I. Aperçu des cultures examinées ou employées, isolées à Leyde, ou bien reçues d'autres laboratoires.

1. *Culture* MEUTSTEGE. Le bacille de cette culture fut isolé des excréments d'un militaire à Leyde en août 1914 par M. KAPSENBERG, à ce moment assistent du Laboratoire de Pathologie comparée. Le malade souffrait de diarrhée, vomissements et fièvre; 4 jours après le début des symptomes on réussit à cultiver des déjections liquides ne contenant pas de sang et de mucus un bacille dysentérique qui fut déterminé ultérieurement comme un type FLEXNER.

2 et 3. *Cultures 1114 et 1408.* M. HORST, assistant au Laboratoire de Pathologie comparée les isola dans deux cas de dysentérie cliniquement bien nets. Un garçon de 15 ans tomba malade le 15 août 1917 avec les symptomes de nausée, entéralgie, diarrhée et fièvre. Il continua son travail pendant deux jours, alors le médecin prescrit le repos. Les déjections montraient parfois de grandes quantités de sang et peu de mucus. Le malade se sentait très indisposé, et affaiblissait considérablement en peu de temps.

Après une therapie appropriée les excréments furent normaux le 22 août; on en isola *la culture 1114*, qui fut deter-

1) Les recherches mentionnées dans ce travail ont été executées avec la collaboration des M.M. Dr. BOS, HORST, KAPSENBERG, KUYK et VAN MANEN.

minée comme un bacille FLEXNER, cependant ne formant pas d'indol.

Dans la famille de M. à Leyde trois petits enfants tombèrent successivement malades avec une diarrhée sanguinolente et fréquente. Les déjections contenaient du mucus et parfois beaucoup de sang.

Deux enfants furent bien vitement rétablis, le troisième cependant restait chroniquement atteint avec des symptomes dysentériques périodiques.

On isola des déjections le *bacille 1408* et aussi dans ce cas on reconnaissait le type FLEXNER.

4, 5, 6 et 7. *Cultures dysentériques* HARTKAMP *et* BOGAERDE, *et deux autres bacilles, isolés dans la même endémie, ne montrant pas les caractères purs des bacilles dysentériques.*

Au courant du mois d'août 1917, pendant les vacances, un asser grand nombre de soeurs de l'Hopital Académique de Leyde tombèrent malade avec les symptomes de gastro-entérite aigue. D'après les protocoles on comptait entre 13 et 21 août 34 malades plus ou sevèrement attaquées. Nausée, vomissements, diarrhée, entéralgies, migraine, douleurs dans les membres et parfois dans d'autres parties du corps étaient les symptomes principaux. Toutes avaient une gastro-entérite, tandisque les déjections ne contenaient qu'exceptionnellement du sang et du mucus.

L'examen étiologique fut installé d'abord par M. KAPSENBERG, à ce moment mon premier assistent, qui pensait à une infection alimentaire, probablement causée par du riz et de la rhubarbe, qu'on avait raison de suspecter quoique seulement une partie des soeurs en eût mangé. Par cette anamnèse on cherchait d'abord des bacilles paratyphique-B ou bien le Bacillus enteritidis; le sang (obtenu par la phlébotomie), les déjections, le riz et la rhubarbe suspects furent examinés dans cette direction; le sérum des malades guéries fut éxaminé sur la présence d'agglutinines.

Pour l'examen des déjections on employa les milieux de DRIGALSKI-CONRADI et de ENDO en on y cherchait surtout des bacilles *mobiles,* qui ne faisaient pas changer la couleur de ces milieux.

Il se montrait cependant que les cultures qui laissaient en

tacte les couleurs des milieux DRIGALSKI-CONRADI ou ENDO et qui par cette qualité pourraient être celles de bacilles typhiques ou paratyphiques, contenaient régulièrement des bacilles *non*-mobiles.

Par cette raison, au fin d'août 1917, quand je revenais à Leyde et parcequ'aussi l'examen du riz et de la rhubarbe n'avait donné aucune indication, j'ai fait examiner si les bactéries isolées montraient les caractères d'un des bacilles dysentériques. Peut-être les circonstances n'étaient pas favorables parce que l'isolement des bacilles n'avait pas été pratiqué toujours des excréments frais; autrement elles étaient favorables par le fait que la plupart des bacilles isolés était immobile. En peu de temps il devenait évident que les cultures *4* et *5*, HARTKAMP et BOGAERDE, s'approchaient des bacilles FLEXNER, tandis que les bacilles *6* et *7*, LOBBE et HARTEVELD, s'approchaient des colibacilles, quoique immobiles, et se distinguaient aussi du Bacterium lactis aerogenes.

8. *Culture 1499*, ENDEGEEST. Le bacille fut isolé dans mon laboratoire des excrément d'un malade souffrant d'une diarrhée sanguinolente aigue. Le micro-organisme, un coccobacille, pouvait être la cause de l'entérite, mais ne possédait par les caractères d'un des bacilles dysentériques connus. Néanmoins la dysentérie était vraisemblable parce que un certain nombre de personnes avait tombé malades à peu près au même époque et avec des symptomes semblables. Plusieurs avaient montré du mucus dans les excréments et chez quelques unes la maladie était mortelle. Justement par ce caractère sevère on faisait examiner les excréments de notre malade qui, d'ailleurs avait guéri après une thérapie bismuthique. Cliniquement la maladie devait être la dysentérie.

9, *10*, *11*, *12 et 13* représentaient des cultures de bacilles dysentériques reçues d'autres laboratoires et ensemencées en passage dans notre laboratoire avec des intervalles regulières. La culture *9* devait être un FLEXNER, la *10* un SHIGA, la *1* un Y. et les *12* et *13* seraient des types-STRONG. La culture 9, provenant d'Amsterdam, montrait régulièrement les caractères d'un FLEXNER en ce qui concerne la fermentation des sucres, la culture *10* ceux du bacilles de SHIGA.

Ce dernier bacille était assez toxique vis-à-vis des lapins.

Quant aux autres bacilles de ce groupe les caractères étaient peu constants. Peut-être les cultures *12* et *13*, STRONG-H et STRONG-K, provenaient de la même source.

Le bacille de SHIGA tué (suspension de la culture sur gelose) tuait des lapins par voie intraveineuse dans une dose de 1 c.c. en 48 heures, par injection intrapéritonéale en dose de 3 c.c. également en 48 heures et par injection sous-cutanée en dose de 1 c.c. en 5 jours.

II. Caractères bactériologiques des bactéries déterminées comme des cultures de Flexner.

Les cultures *1* (MEUTSTEGE), *2 (1114)* *3* (*1408*), *4* (HARTKAMP et *5* (BOGAERDE) isolées au laboratoire, furent diagnostiquées provisoirement toutes comme des cultures FLEXNER à cause de leurs propriétés bactériologiques, qui étaient succinctement les suivantes:

Forme: Des bâtonnets assez courts et ovales.

Mobilité: absente.

Coloration: Ne prend pas le Gram.

Gélatine: N'est pas liquifiée.

Lait: N'est pas congulé (Voir: plus loin).

Indol: Voir: plus loin.

Petit-lait-tournesolé: Rougissement faible au début, devient plus tard parfois un peu bleuâtre, reste clair ou se trouble parfois légèrement.

Rouge-neutre: Pas de changement de couleur et pas de fluorescence.

DRIGALSKI-CONRADI: Formation de colonie bleues-blanchâtres.

ENDO: Colonies non-rouges transparentes.

Pas de fermentation gazeuse en glucose, lactose en saccharose.

Glucose-peptone-tournesolée: rouge.

Lactose-peptone-tournesolée: inaltérée.

Saccharose-peptone-tournesolée: inaltérée.

Mannite-peptone-tournesolée: rouge.

Maltose-peptone-tournesolée: rouge.

Ainsi la diagnose dysentérie par le bacille de FLEXNER n'était pas difficile regardant aussi les symptomes cliniques, bien

qu'ils restaient des difficultés en ce qui concerne la formation d'indol (voir: plus loin).

La question était importante, en ce sens, que chez l'endémie de gastro-entérite aigue parmi les 34 soeurs de l'Hôpital des bacilles dysentériques jouaient un rôle. Si au début l'attention avait été prêtée plus directement à des bactéries immobiles, qui ne changaient pas de couleur les milieux de DRIGALSKI-CONRADI et de ENDO, au lieu de chercher, à propos des communications sur la nourriture, spécialement les bactéries mobiles des infections alimentaires, sans doute il aurait été possible d'isoler de l'endémie un plus grand nombre de bacilles dysentériques. Pour ce dernier but il est en premier lieu désirable de faire l'examen direct des excréments frais, ce qui n'était pas toujours possible par la grande quantité de matière à examiner aussi par la rechercher imposée des bacilles-paratyphiques-B.

De la même endémie provenaient les cultures *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD); quoique immobiles, ces cultures ne présentaient pas les caractères spécifiques des bacilles dysentériques. Nous y revenons plus loin. Il en est de même de la culture *8 (1499)*, (ENDEGEEST), qui était isolée d'un cas de gastro-entérite, provenant d'un milieu où se présentaient à ce moment encore d'autres cas de ce genre.

III. Caractères ou caractères atypiques en rapport avec la diagnose.

En recherchant à notre laboratoire les dites cultures FLEXNER et en ce rapport les autres cultures mentionnées, parmi lesquelles se trouvaient donc aussi d'autres bacilles dysentériques, nous avons rencontré quelques difficultés assez importantes pour y appeler l'attention. Il s'est trouvé que, malgré les différentes méthodes de diagnostic différentiel bactériologique pour indiquer les caractères spéciaux des bacilles dysentériques, les difficultés à ce sujet sont, proprement dit, encore plus grandes que ne le fait présumer la littérature.

Des communications d'autres auteurs il résulte suffisamment qu'il n'existe pas de stabilité dans les caractères ni que les méthodes de diagnostic recommandées ne puissent jamais

échouer, spécialement en ce qui concerne les bacilles appelés non-toxiques ou pseudo-dysentériques. Comme notre examen puisse montrer, il faut peut-être modifier ces méthodes à un certain dégré. Ces recherches concernent donc notamment les bactéries ressemblant à des bacilles FLEXNER isolées à Leyde. Les autres cultures de dysentérie examinées comparativement provenaient d'autres laboratoires et étaient cultivées pas nous en passage; il est connu que de cette manières les caractères originaux puissent parfois se modifier tellement, que les qualités typiques de certains bacilles dysentériques ne se montrent pas toujours très nettes.

Je ne saurais dire si le dysentérie-FLEXNER se présente fréquemment dans notre pays. Nos derniers cas étaient constatés au moment où l'on savait qu'en Allemagne près de nos frontières il y avait plusieurs cas de maladie, qui aient bien été des cas de dysentérie. Nous savons déjà par les recherches connues de SPRONCK 1) qu'on peut s'attendre dans notre pays, à côté de la dysentérie SHIGA-KRUSE, aussi à d'autres formes de dysentérie, à la pseudo-dysentérie de KRUSE, que ne sont pas si dangereuses, et dont on a distingué plus tard 3 on 4 différents bacilles.

D'après les rapports du Laboratoire Central pour la Santé l'ublique on à trouvé chez l'examen d'excréments:

En 1912 des bacilles SHIGA-KRUSE et Y;
„ 1914 „ „ FLEXNER;
„ 1915 et 1916 des bacilles *peu-toxiques.*

Dans le rapport de 1915 se trouvent également les recherches de HEHEWERTH, dont nous ferons mention plus loin. Les agglutinations mentionnés dans ces rapports et executées avec des sérums des malades, et qui indiqueraient un type spécial de bacilles ne sont pas citées ici parce qu'elle me semblent peu prouvantes.

A. *Formation d'indol.*

KUENEN 2), parlant des „bacilles dysentérique peu-toxiques", dit que le bacille-dysentérique Y de HISS et RUSSELL, ne forme en bouillon point ou seulement extrêmement peu d'indol; à ce point il se comporte comme le bacille SHIGA-KRUSE. Un certain pourcentage des cultures, isolées en Deli, faisait fermenter

aussi la maltose comme le fait le type FLEXNER. La réaction en maltose marchait plus lentement que celle en mannite. D'ailleurs les cultures, qui faisaient fermenter la maltose, montraient en bouillon une réaction nette d'indol.

Il résulte de cette argumentation, que KUENEN admet la formation d'indol par le type FLEXNER, cultivé en bouillon.

L'on sait que KUENEN se tient à plusieurs égards à la classification des types peu-toxiques de LENTZ 3). En ce qui concerne la formation d'indol, celui-ci dit que le bacille-FLEXNER forme de l'indol après 3 à 5 jours, pendant que les bacilles SHIGA-KRUSE et STRONG ne formeraient point d'indol, ce que ferait le bacille de HISS et RUSSELL irrégulièrement. SHIGA et MORGAN indiquent cependant, que le bacille-STRONG peut *bien* former de l'indol.

D'après LÜDKE 4) le bacille SHIGA-KRUSE ne forme pas l'indol, en bouillon contrairement du bacille-FLEXNER qui peut former cette matière en bouillon et aussi en solution de peptone. D'après le même auteur les cultures Y et STRONG le forment irrégulièrement.

On se rappele la communication, faite en février 1916 par HEHEWERTH 5) dans l'assemblée de l'Association microbiologique sur: „les bacilles dysentériques et la classification en groupes."

Les cas étaient observés au camp des internés à Zeist en Septembre 1915. Entre autres la formation d'indol fut controlée chez 26 cultures isolées; elle formaient toutes de l'indol (réaction d'après EHRLICH). Suivant la fermentation de maltose toutes les cultures n'étaient néanmoins pas des bacilles FLEXNER, bien qu'il y eût des variations à cet égard: Une culture STRONG se changeait en une culture HISS et six cultures HISS se changeaient à cet égard en des cultures FLEXNER. Cet interprétation pourrait alors se fonder sur la formation d'indol dès le commencement, laquelle d'après LENTZ est irrégulière au sujet des cultures HISS.

Il me parait que communication spéciale de HEHEWERTH: „Réaction d'après ERHLICH", veut dire qu'il considère la réaction de l'indol suivant SALSKOWSKI comme peu-prouvante et que celle d'EHRLICH est préférable.

Après tout ce qu'on a écrit dans les derniers temps sur la recherche de l'indol il n'y a plus de doute à ce point. D'ailleurs pour la recherche de l'indol on ne se servira plus

de cultures en bouillon, mais en solutions de peptone et de sel marin. Et même quand on se sert de cultures en solution de peptone on est obligé d'employer des tubes de contrôle qui ont à prouver que des micro-organismes dont on sait qu'ils ne forment pas de l'indol ne le font pas dans le milieu employé, tandisque des formateurs d'indol le forment réellement. Aussi l'expérience exige encore qu'il ne se forme point de l'indol dans une tube non-inoculée. Nous nous sommes tenus à ces exigeances pendant nos recherches sur les 13 cultures, tandisque ces expériences sont repetées souvent.

Tenant compte des communications des investigateurs déjà nommés la recherche de l'indol suivant EHRLICH fut pratiquée après 5 jours, et encore plus tard, par exemple après 9 jours. Comme il se révèle du tableau suivant, emprunté aux protocoles des recherches repétées avec la collaboration surtout de M. le Dr. BOS et plus tard de M. KUYK, les résultats étaient étonnants, parce que les cultures de FLEXNER sont dits de former de l'indol en 5 jours.

Par cet examen fut confirmé une expérience de M. HORST, indiquant que sa culture 1114 état différente du bacille-FLEXNER en ce qui concerne la formation d'indol. Une communication de M. KAPSENBERG, que la culture-HARTKAMP formerait de l'indol, ne pouvait pas être conformée ni par BOS, ni par KUYK, ni par moi-même; les témoins, qui devaient former de l'indol, le formaient toujours.

1. **Formation d'Indol.**

Culture examinée.	Bouillon		Eau-peptonée		Remarques.
	après 5 jours	après 9 jours	après 5 jours	après 9 jours	
1 Culture MEUTSTEGE.....	—	—	—	—	Cultures (FLEXNER) de Leyde.
2 „ *1114*	—	—	—	—	
3 „ *1408*	—	—	—	—	
4 „ HARTKAMP	—	—	—	—	
5 „ BOGAERDE.....	—	—	—	—	
6 „ LOBBE	+	+	+	+	Cultures douteuses (coli?)
7 „ HARTEVELD	+	+	+	+	
8 „ *1499*-ENDEGEEST .	+	+	+	+	
9 „ FLEXNER-*Amsterd.*	—	—	—	—	Cultures de laboratoire.
10 „ SHIGA-KRUSE	—	—	—	—	
11 „ Y.....	—	—	—	—	
12 „ STRONG H.....	+	+	+	+	
13 „ STRONG K.....	+	+	+	+	

L'examen des cultures en bouillon n'avait lieu que parce qu'elles étaient présentes pour l'étude du developpement dans ce milieu; le résultat était tout à fait conforme à celui des cultures en solution de peptone.

Nos cultures FLEXNER *ne formaient donc point d'indol, ni après 5, ni après 9 jours.*

Il se trouvait, que les bactéries indiquées comme *cultures* STRONG, provenant d'autres laboratoires, formaient *bien* d'indol. La *culture Y* ne le formait pas. L'exception trouvée ne nous paraissait point suffisante de ne pas considérer nos cultures comme des cultures FLEXNER, car la culture de laboratoire FLEXNER *60*, provenant d'Amsterdam, ne formait également pas d'indol.

Pourtant, la possibilité existe que nous avons commis une erreur à cet égard, et qu'il s'agisse d'un autre type de bacille, notamment aussi parce que d'autres auteurs que ceux déjà cités, indiquent le bacille FLEXNER toujours comme formateur d'indol.

Mais alors le bacille isolé ne parait pas être rare: Au „Berliner Klinische Wochenschrift" du 15 avril 1912 on peut lire une communication de BAERTHLEIN *6*), sur 60 cas de maladie, dont plus spécialement ceux examinés le premier étaient sévères, il isolait des cultures, qui en ce qui concerne les réactions des sucres devaient être considérées comme des bacilles FLEXNER, mais qui en bouillon ou bien en eau peptonée ne formaient *point d'indol* après 8 à 16 jours. Il n'y a aucune indication sur la manière dont la reaction fut installée, mais le résultat négatif exclut tout erreur, même si la méthode SALKOWSKI a été pratiquée. Cette bactérie ne fut pas agglutinée par un sérum de SHIGA-KRUSE, de FLEXNER, ou de Y, même à l'examen répété. Au contraire du sérum de lapin vis-à-vis deux des cultures trouvées, faisait agglutiner ces cultures jusqu'à la limite du titre (1 : 1000); le même sérum n'agglutinait les cultures SHIGA, FLEXNER, Y et STRONG. Les lapins préparés montraient de l'amaigrissaient, mais aucun symptome de paralysie.

Le sérum des malades agglutinait les cultures trouvées nettement en dilution de à 1 : 100, mais ne faisait pas agglutiner les cultures SHIGA, Y, FLEXNER ni STRONG, tandisque du sérum normal en dilution de 1 : 100 ne montrait aucune influence.

La virulence et la toxicité des cultures était différente. BAERTHLEIN compte ses cultures positivement parmi les bacilles dysentériques ; cependant elle en diffèrent par les réactions sérologiques et par le non-formation d'indol.

Nos cultures pourraient être identiques à celles de BAERTHLEIN, si elles ne possédaient pas des autres qualités différentes (voir plus loin: *lait*), et s'il n'y avait pas aussi une contradiction au sujet de l'agglutination avec des sérums de lapin spécifiques contre les bacilles Y et SHIGA, préparés à notre laboratoire (voir : plus loin).

Aussi nous ne pouvions pas comparer à une véritable culture FLEXNER, parce que celle, que nous possédions, à savoir culture FLEXNER-*Amsterdam*, correspondait dans ses caractères tout à fait aux bacilles isolés par nous.

* * *

Dans la littérature on trouve mentionné encore un autre bacille qui pourrait être identique à la notre.

D'HÉRELLE 7) donne une description d'une culture de dysentérie atypique, isolée dans des cas observés par BERTHILLON. Cette culture fut trouvée en douze cas de dysentérie haemorrhagique; mannite et maltose furent fermentées, *la réaction d'indol d'après* SALKOWSKI fut négative et le lait ne fut pas coagulé. L'agglutination par les sérums de SHIGA, FLEXNER, HISS, et aussi par ceux des malades, était négative.

Les bacilles étaient assez pathogènes.

A part de l'agglutination avec le sérum des malades, cette culture à beaucoup de ressemblance à celle de BAERTHLEIN. La réaction négative de SALKOWSKI indique bien l'absence de l'indol. Aussi ce bacille-ci est différent du nôtre par sa conduite dans du lait et au sujet de l'agglutination.

Pourtant il en résulte, qu'il y a des bacilles dysentériques qu'on voudrait proclamer des FLEXNER, mais qui ne forment pas l'indol.

B. *Coagulation de lait.*

D'après prèsque tous les auteurs, le lait n'est pas coagulé par les bacilles dysentériques. SPRONCK, KUENEN, LENTZ,

HEHEWERTH, LÜDKE, disent tous expressément que ces bacilles ne causent pas de coagulation.

Parmi les caractères constantes de tous les types, KUENEN indique que les bacilles dysentériques ne changent pas la lactose, ainsi que le BARSIEKOW B (lactose) et la lactose-peptonisée-tournesolée, et qu'ils ne coagulent pas le lait.

Il ajoute encore, que le lait stérilisé à l'autoclave, c'est donc du lait stérilisé à hautes températures, n'est pas coagulé facilement. En ce cas on peut faire apparaître la coagulation en faisant bouillir le lait. Je veux faire remarquer qu'en attendant un peu plus longtemps, on peut observer la coagulation également dans un pareil lait. Il est pourtant recommandable, dèsqu'on veuille se servir d'un lait aussi peu changé que possible, de prendre un lait frais et de le préparer à basse temperature par stérilisation fractionnée tellement que la couleur blanche n'a pas changée.

En recherchant le pouvoir de coaguler le lait nous n'avons pas recontré de difficultés d'abord, mais plus tard il en était autrement de manière qu'il était nécessaire de controler à maintes réprises les résultats obtenus. .

D'abord la non-coagulation fut accepté comme caractère constant des cultures du laboratoire, comme des cultures isolées à Leyde. Des cultures-témoins coli, examinées en même temps, ne laissaient aucune doute à cet égard. Celles-ci faisaient coaguler le lait bien vite, ce que les bacilles dysentériques ne faisaient pas. D'ailleurs, les bactéries LOBBE et HARTEVELD, qui coagulaient constamment le lait en peu de temps contrairement aux bacilles dysentériques, fournissaient des cultures-témoins bien faciles.

Plus tard des difficultés se présentaient quand se révélait que les bacilles du type FLEXNER montraient la faculté de coaguler le lait très lentement et d'une manière diffuse avec production de très peu de lacto-sérum; après ébullition la coagulation devenait plus nette. Nous avons pratiqué un grand nombre d'expériences en ce sens, et il était plus particulièrement le Dr. BOS, travaillant à cette époque dans mon laboratoire, qui s'en est occupé. Plus tard, M. KUYK et moi nous les avons répétées. Il s'en résultait que évidemment les bactéries FLEXNER, isolées par nous, mais aussi celle provenant d'Amsterdam,

montraient la tendance de coaguler le lait après 7 jours au minimum, mais ordinairement plus tard. Les bactéries 10 (SHIGA-KRUSE), 11 (Y), 12 (STRONG-H), 13 (STRONG-K) ne montraient jamais ce symptôme, tandis que les bactéries *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD), qui possédaient plusieurs qualités coliformes, coagulaient le lait toujours plus vite. Le phénomène anormal fut découvert lorsque, par hasard, des cultures en lait furent retenues plus longtemps que d'ordinaire. Consultant un tableau, élaboré quelque temps auparavant, on voyait par exemple que des cultures en lait conservées pendant 9 jours ne montraient pas de coagulation sauf dans les cultures 6 (LOBBE) et 7 (HARTEVELD). Néanmoins la coagulation s'observait constamment dès qu'on conservât les cultures pendant un certain temps, et les expériences repétées plusieurs fois en donnaient toujours la confirmation. Ce fait signifie un autre caractère spécial lequel doit être annoncé comme la non-formation de l'indol, quoiqu'il soit moins régulier que celle-ci; pour l'apparition il est souvent nécessaire d'attendre plus longtemps que neuf jours, parfois même troix semaines et encore de plus.

C. *Fermentation en solution de peptone glycosée.*

Toutes les bactéries mentionnées produisaient de l'acide et faisaient changer de couleur le tournesol; cependant ce changement n'était pas toujours le même. Si l'on préparait une solution de peptone glycosée et tournesolée bien claire et en y ensemençait les bactéries à examiner, le liquide devenait rouge-transparent chez les bactéries *1* (MEUTSTEGE) *2 (1114)*, *3 (1408)*, *4* (HARTKAMP), *5* (BOGAERDE), *6* (LOBBE), *7* (HARTEVELD), *9* (FLEXNER-*Amsterdam*) et *10* (SHIGA-KRUSE), mais rouge-opalisant chez 8 (*1499*, ENDEGEEST), *11* (Y), *12* (STRONG-H) et *13* (STRONG-K), en ce sens que chez les premières cultures il se formait un précipitat sous un liquide clair tandis que chez les dernières ce liquide restait troublé.

D. *Fermentation en solution de peptone et de mannite.*

Toutes les bactéries FLEXNER, comme les bactéries *6* (LOBBE), *7* (HARTEVELD), *11* (Y), *12* (STRONG-H) et *13* (STRONG-K)

formaient de l'acide dans la solution de mannite comme il est connu des bactéries dysentériques.

E. *Fermentation en solution de peptone et de maltose.*

Aussi dans ce cas toutes les bactéries FLEXNER formaient de l'acide, de même que les types *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD). Au contraire les bactéries *8* (*1499* ENDEGEEST), *10* (SHIGA-KRUSE), *11* (Y), *12* (STRONG-H) et *13* (STRONG-K) ne proclamaient point la fermentation acide.

F. *Fermentation en solution de peptone et de saccharose.*

Dans ce cas seulement les bactéries *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD) causaient le changement de couleur de tournesol cependant le premier d'une manière peu nette. Les bacilles de STRONG ne changeaient point contrairement aux données de LENTZ. Si ce n'est pas la suite de variation simple causée par les cultures successives pendant un temps prolongé, on pourrait penser à des cultures Y de HISS. Mais ce n'est pas d'accord avec la formation d'indol qui était négative pour l'Y, et positive pour les cultures STRONG, un point qui n'est pas à négliger. Ainsi il existe une différence à moins que la formation d'indol ne soit pas une variation pour elle-même, ce qui n'est pas opposé par le données des auteurs cités.

G. *Agglutination par des sérums de lapin.*

Le diagnostic des bacilles *1* (MEUTSTEGE), *2* (*1114*) et *3* (*1405*) comme des bacilles de FLEXNER s'était basé sur les qualités bactériologiques principales des bacilles dysentériques. La conduite anormale en ce qui concerne la production d'indol et la coagulation de lait peut être considérée comme s'opposant envers la diagnose mais l'opinion contraire est encore toujours possible. La formation d'indol pour elle-même est un caractère des bacilles dits pseudo-dysentériques qui est encore trop peu etudié pour pouvoir dominer dans le diagnostic. Et la conduite en culture de lait avait echappé à l'observation par ce que la coagulation n'apparait que à un moment beaucoup plus tard que chez les cultures de contrôle.

D'ailleurs le diagnostic des cultures *2* (*1114*) et *3* (*1408*)

avait trouvé un appui dans le fait que dans ces cas M. HORST avait cliniquement reconnu la dysentérie chez les malades.

Au laboratoire nous avions à notre disposition un sérum de lapin préparé contre la culture *1* (MEUTSTEGE) et d'un titre 1 : 1600 à 3200. On s'en servait pour reconnaître les autres cultures isolées. De cette manière il se prouvait que les cultures *2* (*1114*) et *3* (*1408*) furent agglutinées par ce sérum jusqu'à la limite du titre, mais on trouva bientôt qu'un sérum de lapin *normal* de même peut agglutiner les cultures FLEXNER dans des dilutions assez considérables. Ainsi une agglutination par un sérum dit spécifique de lapin jusqu'à 1 : 1200 ne signifie rien ou pas beaucoup parce qu'un sérum normal peut agglutiner jusqu'à 1 : 1200 ou même plus haut, comme il sera montré encore plus loin.

N'oublions pas ce fait il se montrait néanmoins que toutes nos cultures FLEXNER par l'agglutination assez forte pas le sérum-MEUTSTEGE s'approchaient de cette dernière culture. Mais en même temps toutes les cultures ressemblaient à la culture FLEXNER qui provenait d'*Amsterdam*. Cette dernière marchait toujours parallèle aux cultures FLEXNER de *Leyde*, aussi en ce qui conserve la formation d'indol et la conduite dans du lait.

L'observation que le sérum normal de lapin peut agglutiner en de fortes dilutions poussait à l'installation d'un grand nombre d'agglutinations pratiquées notamment par M.M. le Dr. BOS et KUYK, et qui s'étendaient sur les 13 cultures mentionnées antérieurement; on y utilisa le sérum MEUTSTEGE indiqué plus haut (titre 1 : 1600 à 3200), un sérum Y (titre 1 : 3200 à 6400 et préparé dans notre laboratoire) et un autre sérum FLEXNER (titre 1 : 4800, préparé de la culture *1114*). En outre nous avons préparé un sérum SHIGA-KRUSE d'un titre 1 : 2000 à 3200. Notre culture SHIGA-KRUSE donnait parfois des difficultés à l'agglutination par ce qu'elle même dans des suspensions très diluées et très homogènes montrait souvent le phénomène d'agglutination *spontanée*, où il se formait au fond de la tube un précipitat membraneux, floconneux et bien régulier, pourvu d'un contour plus ou moins épais et ramifié, se distinguant de cette manière d'un précipitat ordinaire qui se dépose au point le plus bas de la tube. Ce phénomène fut la

cause de difficultés chez l'agglutination de la culture SHIGA-KRUSE par les sérums FLEXNER, et aussi chez la titration du sérum SHIGA envers sa propre culture.

Toutes les agglutinations furent pratiquées *macroscopiquement* parce que cette méthode est la plus facile et la plus exacte quand il s'agit d'un grand nombre d'agglutinations. Par un peu d'expérience il est asser facile de distinguer une *agglutination précipitante* d'une précipitation ordinaire de l'antigène, tandis qu'aussi la clarification peut donner des indications.

Les cultures restaient dans l'étuve à 37° C. pendant au moins 6 heures. Le jugement final de l'agglutination avait lieu au bout de 24 heures.

On peut lire dans le travail de SPRONCK ou »X. Aperçu des résultats obtenus«, comme suit:

»Le bacille des deux espèces de dysentérie (c'est-à-dire »l'épidémique et l'endémique) se ressemblent cependant telle»ment qu'on a besoin d'un réactif spécifique pour les diffé»rencier, lequel consiste dans le sérum d'un animal qui a été »fortement immunisé contre le bacille de la dysentérie »épidémique«.

Et plus loin: »C'est pour cette raison que dans le diagnostic »bactériologique le sérum d'un animal qui a été immunisé avec »un seul bacille de la dysentérie endémique, ne peut pas être »employé comme réactif pour différencier les dysentéries épide»mique et endémique. Car l'absence d'une réaction positive »n'exclut point la possibilité de la présence d'un bacille de la »dysentérie endémique parce que le sérum employé n'aggluti»nera pas tout autre bacille de cette dysentérie«.

Les recherches de SPRONCK démontrent d'ailleurs qu'un sérum de SHIGA n'agglutine que le bacille de ce nom, point ceux de la dysentérie endémique, tandis qu'un sérum préparé avec les bacilles de la dysentérie endémique devrait être polyvalent pour pouvoir reconnaître les derniers.

SPRONCK travaillait avec un titre agglutinant *maximal* du sérum de 1 : 2000 en ce qui concerne la dysentérie épidémique. L'agglutination se faisait en cultures de bouillon de 24 heures et sur les résultats il se prononce comme suit:

»Agglutination en dilution forte (par exemple 1 : 500 en

employant un sérum d'un titre 1 : 500 à 1 : 1000) fait penser à l'existance de la dysentérie épidémique, absence de l'agglutination ou bien agglutination faible à la dysentérie endémique«.

Pour la préparation des sérums SPRONCK se servait de chevaux que, selon lui, donnent de meilleurs résultats que des lapins ou des chèvres. Le titre du sérum de cheval contre la dysentérie endémique ne surpassait pas 1 : 400.

Aujourd'hui on se sert bien généralement du sérum de lapin, et on réussit ordinairement asser facilement à obtenir un sérum d'un titre agglutinant satisfaisant, mais il est bien possible que, justement à l'égard du pouvoir agglutinants des sérums de lapin normaux, le sérum de cheval serait préférable.

En ce qui concerne les bacilles dysentériques isolés à *Leyde* il se montrait bien vite que quoiqu'ils fussent agglutinés parfois par des sérums normaux dans des dilutions de 1 : 1200 et même plus hautes, l'agglutination par les sérums spécifique de MEUTSTEGE ou de *1114* était constamment plus forte, allait comme règle jusqu'à la limite du titre, ainsi pour le sérum de MEUTSTEGE souvent jusqu'à 1 : 3200. Ce phénomène s'observait aussi chez les bacilles HARTKAMP et BOGAERDE isolés ultérieurement aux autres, mais aussi promptement chez le bacille de FLEXNER reçu d'*Amsterdam*.

Tous ces bacilles devaient être regardés comme identiques; ils se manifestaient par les qualités générales et notamment par leur conduite à l'égard des sucres comme des *bacilles* FLEXNER, *qui d'ailleurs étaient atypiques, 1°. en ce qui concerne la formation d'indol et 2°. par la coagulation ou altération retardée du lait.*

Nous n'avons pas réussi a préparer des sérums agglutinants de lapin à titres élévés. Ordinairement ils allaient jusqu'à 1 : 3200, et aux maximum jusqu'à 1 : 6400.

LENTZ dans sa monographie a consacré un chapître spécial à la »différenciation par le sérum spécifique«, lequel se rapporte surtout à l'agglutination. Autrefois, LENTZ et MARTINI, à l'aide d'un sérum de lapin et de chèvre contre le bacille de SHIGA-KRUSE et celui de FLEXNER, avaient demontré qu'il existe une différence entre les bacilles de SHIGA, de FLEXNER et de STRONG. Après la découverte du bacille Y (de HISS et RUSSELL) il se montrait cependant que ce bacille était diffici-

lement à reconnaître par un sérum Y, et que les bacilles FLEXNER et Y sont agglutinés souvent jusqu'à la valeur titrique par un sérum de FLEXNER. Et aussi bien d'autres auteurs ont rencontré beaucoup de difficultés en ce qui concerne la séparation mutuelle des bacilles dysentériques non-toxiques à l'aide de l'agglutination par le sérum de lapin, aussi même quand on se servait de la méthode de CASTELLANI. On s'incline à douter de la valeur de l'agglutination a ce point, même quand on sait que KRUSE, se servant aussi du procédé de CASTELLANI, vient de créer pas moins que 7 bacilles dysentériques non-toxiques différents. Des auteurs ultérieurs ont eu toujours des difficultés pour placer les bacilles trouvés dans les groupes de KRUSE et souvent les résultats étaient tellement incertains qu'on pensait être obligé d'augmenter encore le nombre des groupes.

En 1916 KRUSE 8) vent encore maintenir sa classification obtenue à l'aide de l'agglutination, mais il est bien évident qu'aussi lui rencontre des difficultés en appliquant cette méthode. Néanmoins il s'oppose aussi contre la classification de LENTZ basée sur la fermentation des sucres.

Dans leur travaux les plus récents ni LENTZ ni KRUSE font mention de la valeur agglutinante des sérums de lapin employés. Dans les discussions suivant le discours de KRUSE, GOTSCHLICH a communiqué que des bacilles de SHIGA-KRUSE, isolées par lui, furent agglutinés jusqu'à la limite du titre par un sérum de FLEXNER, une particularité qui diminuait par le passage des cultures; le même phénomène ne se montrait pas en employant un sérum Y. Le fait fut confirmé plus tard par KRUSE. On n'a pas mentionné les chiffres de l'agglutination, et aussi est-il possible que les communications se rapportent à des agglutinations par des sérums de l'homme.

LENTZ dans sa monographie s'occupe encore de la question dans le chapître „Agglutination". Pour lui ce sont notamment des lapins qui se prêtent à la préparation des sérums, parce qu'ils ne forment pas un si grand nombre de para-agglutinines, comme les chevaux ou les chèvres. Mais les données de LENTZ sur le diagnostic des bacilles dysentériques par moyen des sérums de lapin ne sont pas très évidentes.

C'est LÜDKE qui a installé un nombre de recherches dans

ce sens et qui commence par la communication d'un grand nombre d'expériences avec des sérums normaux. Il en résulte que ces sérums normaux n'agglutinent que très faiblement les bacilles de SHIGA et de FLEXNER et que les sérums de lapin vis-à-vis du FLEXNER ne dépassent par 1 : 20. LÜDKE estime que ceci est en concordance avec les résultats d'auteurs précédents.

D'ailleurs LÜDKE a demontré que, comme règle général, des sérums agglutinants n'ont qu'une action assez faible sur les bacilles autres que ceux dont ils ont été préparés ; ordinairement l'agglutination ne dépasse pas 1 : 40, et aussi ce résultat-ci il appelle conforme à ceux d'autres auteurs.

Ensuite il s'occupe de la préparation des lapins pour obtenir des sérums agglutinants. Des titres de 1 : 1000 à 1 : 2000 sont appelés très hauts.

Il a appliqué ces sérums en dilutions maximales de 1 : 3000 ; il n'obtenait pas d'agglutination dans ce cas avec le sérum de SHIGA. Avec le sérum de FLEXNER il ne dépassait pas 1 : 1000 et obtenait seulement des traces d'agglutination. Dans les dilutions les plus élevées le sérum de FLEXNER n'agglutinait pas le bacille de SHIGA, et l'inverse.

Il marquait les résultats après 2 heures ; comme on croit aujourd'hui, ce délai est trop court, parce que après 2 heures l'agglutination peut augmenter considérablement, et, au contraire, peut encore commencer après ce moment. En tout cas il est nécessaire de lire le résultat de l'agglutination après 24 heures ce qui est prouvé aussi dans nos propres expériences.

Par ce fait il est bien difficile d'interprêter les résultats de LÜDKE. Neanmoins il est bien important de rémarquer qu'aussi des autres que nous avons réussi bien facilement à obtenir des sérums de lapins contre les bacilles de FLEXNER, de SHIGA et contre le bacille Y., dont les titres surpassaient 1 : 2000 à 1 : 3000. Notre sérum-MEUTSTEGE que était inscrit à un titre de 1 : 1600 à 1 : 3200, agglutinait souvent plus fort que 1 : 3200. Probablement le contrôle après 24 heures se fait voir ici.

Mais nous avons trouvé aussi des titres normaux très élevés, parfois plus que 1 : 1200, même 1 : 1600 et encore plus haut. Possiblement le même facteur, c'est-à-dire le contrôle après 24 heures, est ici présent, mais alors il est bien étrange que d'autres auteurs n'ont par remarqué ce même phénomène important.

On pourrait s'incliner un moment à accepter une agglutinabilité augmentée des bacilles eux-mêmes, mais l'action elevée des sérums normaux de lapin est beaucoup plus vraisemblable; *et dans la pratique on doit en tenir compte!*

Nous avons réagi avec nos sérums agglutinants et en même temps aussi avec des sérums normaux dans des dilutions de 1 : 1200 et encore plus fortes. Les expériences furent répetées un grand nombre de fois. Les résultats permittaient d'élaborer le tableau de page 25. *Il en résulte qu'une agglutination positive ou négative avec un sérum agglutinant de lapin assez fortement dilué pour elle ne donne par le droit de proclamer des différences d'espèce ou de type.*

La determination des bacilles dysentériques à l'aide de l'agglutination par un sérum de lapin spécifique exige une grande prudence en ce qui concerne l'interprétation parce qu'un sérum normal peut agglutiner assez fortement.

KUENEN, dans son article sur la dysentérie, en parlant de l'agglutination estime la preuve de la présence d'une espèce connue seulement complète dans le cas où, à côté des qualités culturelles, l'agglutination par un sérum spécifique est présente à titre élevé. Ce règle serait aussi valable pour les bacilles dysentériques.

Il a préparé les sérums en utilisant des chèvres, et est d'opinion que les sérums SHIGA-KRUSE, Y et FLEXNER donneront ordinairement des résultats satisfaisants qu'and on possède des séries de sérums de deux laboratoires différents. Dans ce cas on échappera à la possibilité de travailler avec un sérum qui á été préparé avec un des types rares et déviants et qui réagit avec les types ordinaires d'une manière incomplète ou bien ne réagit pas.

KUENEN ne dit rien sur l'agglutination avec le sérum de chèvre normal. Mais il semble avoir travaillé avec des sérums de haute valeur ce qui sans doûte est très avantageux. Pourtant il ne donne pas des chiffres précises avec l'exception qu'il mentionne comme titre de son sérum Y 1 : 10.000 lequel est vraiment très haut.

D'autres récherches détaillées sur l'agglutination ont été executées par HEIHEWERTH. Il a immunisé deux lapins et le sérum obtenu avait un titre agglutinant de 1 : 2000, ce qui prouve que les sérums employés par nous étaient plus forts. Le premier sérum de HEIHEWERTH avait été préparé avec un

bacille qui faisait fermenter la mannite et la maltose, le second avec un qui attaquait seulement la mannite. Suivant ces qualités les bacilles de HEHEWERTH seraient respectivement un FLEXNER et un Y.

L'agglutination procurait des résultats bien singuliers et ne marchait pas parrallèle à la fermentation des sucres, néanmoins, l'agglutination était favorable au groupement des bacilles en ce sens que les bacilles provenant d'un seul malade furent reconnus comme parents. Aussi l'application de la méthode de CASTELLANI ne portait l'agglutination point en concordance avec la fermentation des sucres. Ce qui est bien intéressant dans les recherches de HEHEWERTH, aussi pensant à mes propres résultats, c'est qu'il parle de deux types 78 (a—e), qui tous les deux furent agglutinés par les deux sérums jusqu'à la limite du titre, après l'absorption des propres agglutinines par les bacilles-antigènes, *ce qui signifie une paragglutination très forte.*

Ce dernier fait le rend regrettable que HEHEWERTH ne mentionne point les titres des sérums normaux, compréhensible d'ailleurs parce qui le travail produit est bien considérable; mais probablement l'interprétation des résultats de HEHEWERTH en aurait profité. En appliquant les agglutinations et celles avec absorption, il monte de 1 : 1000 à 1 : 2000 sans titre intermédiaire; probablement les agglutinations 1 : 2000 possèdent une valeur *spécifique*, mais parmi les 1 : 1000 ils en peuvent être des *réactions normales* en ce qui concerne les bacilles qui appartiennent au type FLEXNER selon la fermentation des sucres. Que, vraiment, HEHEWERTH a eu affaire aux mêmes symptômes que celles observées par nous, est prouvé par son type FLEXNER de laboratoire. Celui-ci n'agglutinait plus fort que 1 : 400, ce qui est bien étrange quand on sait que son sérum 62 (sérum de lapin 77b) était bien probablement un sérum de FLEXNER; de même il est étrange que des 13 bacilles probables de FLEXNER, agglutinés avec ce sérum, seulement 3 montraient une agglutination nette de 1 : 1000... tandisqu'aucun n'agglutinait jusqu'à 1 : 2000. Peut-être cette agglutination n'était point spécifique mais la suite d'agglutinines normales.

HEHEWERTH a préparé aussi un sérum contre un probable bacille Y; ce sérum exerçait une autre action envers les bacilles

probables de FLEXNER que le précédent; ces derniers et aussi ceux du type Y furent agglutinés constammant plus haut. Beaucoup d'agglutinations 1 : 1000 étaient positives, mais — comme autrefois — les agglutinations nettes de 1 : 2000 étaient rares. Aussi dans ce cas on s'incline à penser à des agglutinations normales.

Vraisemblabelement c'est encore le cas dans ces expériences d'absorption où les propres-aggulitinines ne furent pas absorbées. Il résulte 1°. de la paraglutination forte mentionnée par HEIHEWERTH et citée plus haut, et 2°. de ces cas où les agglutinations 1 : 2000 sont négatives ou peu nettes et celles de 1 : 1000 positives ou peu nettes.

En tout cas nous croyons avoir demontré qu'il est nécessaire de tenir compte des agglutinations par un sérum de lapin *normal*, plus particulièrement en ce qui concerne les bacilles isolé en Hollande et qui s'apprôchent de type FLEXNER. Probablement aussi les recherches de HEHEWERTH en sont une preuve. Acceptant ce fait HEHEWERTH a toujours raison quand il dit que la classification de LENTZ basée sur la fermentation des sucres n'est pas exacte; mais les agglutinations exécutées par lui doivent être répétées avec des sérums d'un titre plus fort et à de plus fortes dilutions.

Cette question de l'agglutination par des sérums normaux semble d'un grand intérêt aussi quand on étudie encore d'autres données de la littérature. Dans leur très soigné *Précis de Bactériologie* 9) DOPTER et SACQUEPÉE donnent un petit tableau sur la distinction des bacilles SHIGA, FLEXNER et HISS. On y lit qu'un sérum SHIGA n'agglutine que le SHIGA, un sérum FLEXNER agglutine le FLEXNER et le HISS, et de même un sérum HISS agglutine le FLEXNER et le HISS. Le texte ne donne que très peu d'éclaircissement. On dit du bacille SHIGA-KRUSE qu'on peut préparer un sérum agglutinant du lapin, de la chèvre, de l'âne, du cheval, etc., et plus loin: »Le sérum normal n'est jamais agglutinant pour les bacilles dysentériques (le FLEXNER cependant peut être agglutiné à $^1/_{50}$ et même $^1/_{80}$).« Dans cette remarque je lis un avis en ce qui concerne le sérum normal. Une autre remarque disant que le Y est toujours agglutiné par le sérum FLEXNER et l'inverse et bien poussé trop loin.

RUGE 19) dit qu'on ne peut pas différencier les bacilles dysentériques non-toxiques à l'aide d'un sérum spécifique de lapin et il ne parle point de l'action des sérums normaux. Aussi REMLINGER et DUMAS omettent ce point dans leur travail sur la dysentérie en ARGONNE 11). NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU 12) ont fait des recherches sur le bacille de SHIGA, dans lesquelles ils mentionnent des agglutinations normales du bacille de FLEXNER par le sérum de lapin normal de 1 : 100, tandis que le titre du sérum spécifique était de 1 : 1000. Dans un travail de DEBAINS 13) sur les bacilles FLEXNER et Y on peut lire que le sérum normal de lapin n'agglutine point les bacilles de FLEXNER.

Enfin ce resumé déjà très long ne peut pas être terminé sans donner l'opinion de PRIBRAM et HALLE, 14) qui appellent leur travail la suite de celui de LENTZ dans le livre de KOLLE et WASSERMANN.

Il en résulte qu'il est extrêment difficile de séparer les cultures de FLEXNER, de Y et de STRONG soit par l'agglutination soit par la fermentation des sucres; mais, disent les auteurs, l'agglutination peut donner des résultats si l'on prend acte de quelques détails. Il faut que les bacilles employés soient agglutinables; l'agglutination doit se faire comme une membrane et en grands flocons; la précipitation de granules fins, et comme un conglomérat au fond de la tube, ne signifie pas l'agglutination.

Concernant ce point il est nécessaire de faire les remarques suivantes:

1°. Bien certainement les bacilles doivent être agglutinables, mais la non-agglutinabilité ne se rencontre que très peu. Cependant il y a un autre obstacle qui peut se présenter et qu'on connait aussi des vibrions cholériques, c'est-à-dire la soi-disante *agglutination spontanée*, où la suspension de l'antigène s'agglutine et précipite dans la forme d'une membrane. Notre bacille de SHIGA le montrait parfois très nettement.

2°. Vraiment on doit exiger, comme le font PRIBRAM et HALLE et d'autres, une différence entre le précipitat de bacilles réellement agglutinés et celui des non-agglutinés, mais il faut l'exiger autrement qu'ils ne le disent.

Le précipitat des bacilles agglutinés se montre comme une membrane au fond de la vase avec une marge qui est bien

souvent épaissie et ramifiée. En secouant le précipitat est floconneux. Si l'on employait un antigène trop épais on obtient la membrane descrite, mais souvent en même temps au point le plus profond de la tube un conglomérat de bacilles, entouré par la membrane. En secouant le précipitat est plus ou moins floconneux. La clarification de la liquide est plus ou moins parfaite.

L'antigène étant très dilué, ou bien l'agglutination étant faible, la membrane peut être très mince, de même que la marge, tandis que la clarification puisse manquer. En mouvant la tube les flocons se montrent très fins, et il est impossible de voir la différence entre floxons fins et granules fins. Dans ces cas le critérium est la membrane qui se tranche nettement contre la verre par sa marge. Ainsi l'agglutination n'est pas présente quand il n'existe pas de précipitat ou bien seulement un conglomérat au point le plus profond de la tube. Peut-être PRIBRAM et HALLE ont voulu dire le même en écrivant: »Für den Ausfall der makroskopischen Agglutination massgebind ist nur die grobflockige (mit Häutchenbildung am Glasrande), nicht die feinkörnige (Knöpchenbildung am Glasrande)«, s'ils entendent par »Glasrand« le paroi de la tube.

Il va sans dire que dans tous les cas les tubes de contrôle continant l'antigène sans sérum et l'antigène avec du sérum normal sont indispensables pour pouvoir marquer le résultat, tandis qu'on doit penser à la possibilité de l'agglutination spontanée.

PRIBRAM et HALLE ne veulent pas reconnaître la classification des races (comme ils les appellant avec RUGE) d'après la fermentation des sucres. Ils exigent des épidémies ou des endémies pour les bacilles dysentériques. S'il en est autrement les bacilles peuvent être des cultures de *coli-aerogenes*. Pour elle ni l'agglutination ni la fermentation des sucres sont prouvantes; le caractère épi- ou endémique de la maladie est nécessaire pour pouvoir parler de bacilles dysentériques.

Dans leur travail on ne trouve pas de données sur l'agglutination par du sérum normal. Ils notent le résultat après 24 heures et estiment l'aglutination microscopique impropre.

Nos bacilles de *Leyde* se rapprochant du type FLEXNER, mon-

traient assez fortement l'agglutination par du sérum de lapin normal. Le phénomène n'était pas constant mais à peu près regulièrement présent. Une agglutination de 1 : 1200 et encore de plus était très ordinaire. Les cultures des bacilles de STRONG présentaient parfois une agglutination avec du sérum normal de lapin de 1 : 300, et même le Y et le SHIGA ne pouvaient pas toujours échapper au phénomène. Le tableau suivante donne une idée des agglutinations avec le sérum normal et avec le sérum *1114* et Y.

2. Agglutination par du sérum de lapin spécifique et normal.

Bacille examiné.	Sérum.	Agglutination maximale.	Controlé apèrs:
1 Bacille MEUTSTEGE.....	Sérum-1114 (2)	1 : 4800	24 heures
9 „ FLEXNER-*Amsterdam.*	„	1 : 4800	„
10 „ SHIGA-KRUSE.....	„	1 : 1000	„
1 „ MEUTSTEGE.....	Sérum Y (11)	1 : 6400	„
9 „ FLEXNER-*Amsterdam.*	„	1 : 6000	„
10 „ SHIGA-KRUSE.....	„	négatif	„
1 „ MEUTSTEGE.....	Sérum *normal*	1 : 2000	„
9 „ FLEXNER-*Amsterdam.*	„	1 : 1400	„
10 „ SHIGA-KRUSE.....	„	1 : 400 jusqu'à 1 : 1400 (pas nette)	„

L'agglutination spécifique surpasse considérablement celle du sérum normal mais néanmoins la dernière est très forte.

Nos sérums MEUTSTEGE, *1114* et Y agglutinaient promptement les bacilles isolée à Leyde, et aussi le FLEXNER d'Amsterdam, jusqu'à la limite du titre et beaucoup plus fort que le sérum normal; le sérum de SHIGA n'allait pas jusqu'au titre. Les premiers sérums agglutinaient aussi le bacille SHIGA, qui était très agglutinable, mais n'allaient pas peu loin que le sérum normal. Nos sérums FLEXNER agglutinaient aussi le bacille 7 (HARTEVELD) provenant de l'endémie de l'hôpital académique, tandis que ce bacille s'approchait du colibacille. Ces sérums n'exerçaient pas d'influence sur les bacilles Y et STRONG. Mais le sérum Y agglutinait bien les bacilles de STRONG. D'après LENTZ ces derniers seraient des bacilles Y, parce qu'il font fermenter

la saccharose; mais il forment de l'indol, tandis que notre bacille Y ne le fait point (voir: plus haut). L'agglutination était donc d'accord avec la fermentation. Les bacilles *7* (HARTEVELD), *6* (LOBBE) et *8* (*1499*-ENDEGEEST) ne furent pas agglutinés par le sérum Y, et le dernier bacille était aussi insensible au sérum de SHIGA. Le sérum SHIGA appliqué à nos bacilles de FLEXNER dans la dilation de 1 : 1200 n'agglutinait pas toujours mais souvent. Le tableau *3* donne une aperçue des agglutinations avec les sérums spécifiques et normaux dans la dilution de 1 : 1200. ± *veut dire que l'agglutination peut être positive ou négative mais plus souvent positive,* ± × veut dire que l'agglutination était parfois positive parfois négative. Le contrôle se faisait après 24 heures.

3. Agglutination 1 : 1200 par du sérum spécifique et du sérum normal de lapin.

Bacille examiné.	Sérum normal.	Sérum MEUTSTEGE (1)	Sérum 1114 (2)	Sérum Y (11)	Sérum SHIGA (10)
1 Bacille MEUTSTEGE..	±	+	+	+	+
2 „ *1114*.....	±	+	+	+	+
3 „ *1408*.....	±	+	+	+	+
4 „ HARTKAMP...	±	+	+	+	+
5 „ BOGAERDE ...	±	+	+	+	+
6 „ LOBBE.....	—	—	—	—	—
7 „ HARTEVELD..	—	± ×	± ×	—	—
8 „ *1499*-ENDEGEEST	—	—	—	—	—
9 „ FLEXNER-*Amsterdam*	±	+	+	+	+
10 „ SHIGA-KRUSE.	±	+	+	+	+
11 „ Y.....	—	—	—	+	—
12 „ STRONG II...	—	—	—	+	—
13 „ STRONG K...	—	—	—	+	—

En étudiant le tableau il se montre qu'on peut avoir des résultats bien trompeurs quand on emploie des sérums de bas titre ou bien peu dilués, et si l'on oublie de taxer l'agglutination par du sérum normal à 1 : 1200 ou encore plus haute.

En employant des sérums à titre élevé il est possible d'arriver au but à moins que le titre des sérums normaux ne soit pas trop élevé; dans ce cas le résultat est toujours un peu dubieux comme il est demontré par les chiffres du tableau 2.

H. *Agglutination par des sérums humains.*

Aussi dans ce cas nous avons eprouvé les difficultés causées par l'agglutination des sérums normaux et il était toujours remarquable que le bacille FLEXNER d'*Amsterdam* se portait comme les bacilles isolés à *Leyde*. Il est justement à cause de l'agglutination par des sérums *humains* normaux que nous nous sommes occupés si longtemps des agglutinations par les sérums normaux de *lapin*.

Le sérum des malades dysentériques est dit de devenir agglutinant environ 8 à 10 jours après le moment de l'infection. Le phénomène s'augmente pendant la reconvalescence ce qui se continue souvent après la guérison pour disparaître ultérieurement.

Il est souvent possible de poser de cette manière la diagnose de l'infection par le bacille de SHIGA, quoique les bacilles non-toxiques puissent être co-agglutinés. Si l'infection est causée par ces derniers, comme règle le *Shiga* n'est pas agglutiné tandis que les non-toxiques entre eux ne sont pas à séparer. Peut-être dans ces cas un sérum animal spécifique peut conduire au but par l'agglutination jusqu'à la limite du titre.

Cependant les données de litérature concernant la co-agglutination des bacilles non-toxiques par un sérum de SHIGA et la non-agglutination du bacille de SHIGA par les sérums contre les non-toxiques ne sont pas toujours uniformes et souvent contradictoires. Aussi semble-t-il que dans de tels cas le sérum de cheval donne toujours un plus grand nombre de co-agglutinations que le sérum de lapin.

L'agglutination des bacilles dysentériques par le sérum des malades est généralement mentionné à titre peu élevé. 1 : 100 et 1 : 200 sont déjà des dilutions asser fortes. D'après LÜDKE il est possible d'arriver à 1 : 1000 jusqu'à 1 : 2000 pendant la reconvalescence, mais comparé à d'autres résultats ces chiffres semblent très hautes. Comme règle on reste au-dessous de 1 : 500.

LÜDKE, dans sa monographie, est très circonstancié sur l'agglu-

tination par le sérum des malades. La contrôle était faite après deux heures, c'est-à-dire, comme on l'accepte à présent, 22 heures trop tôt. Pour le bacille de SHIGA il a trouvé rarement une agglutination jusqu'à 1:2000, 1:500 est exceptionelle, 1:50 se trouve souvent. Cependant maintes fois il a trouvé de l'agglutination, même jusqu'à 1:50, chez des personnes souffrantes ou guéries de la fièvre typhoide ou de malades de la foie ou du sang. De 8 personnes absolument saines le sérum ne contenait pas d'agglutinines. Il résulte de ces données que l'agglutination par le sérum de malades *non-dysentériques* fut observée plus d'une fois et très nettement. LÜDKE est d'opinion que cette dernière agglutination ne peut point faire la concurrence à l'agglutination spécifique dans les cas de dysentérie mais, comme il me semble, cette conception manque d'objectivité.

Quoique LÜDKE ait obtenu dans des cas de dysentérie ou de reconvalescence des agglutinations de 1 : 2000, il accepte néanmoins avec d'autres auteurs que 1 : 50 est concluante pour l'infection par le SHIGA et 1 : 100 pour celle de FLEXNER. Il est évident que cette conclusion est trop risquée justement par les agglutinations normales ou plutôt les agglutinations non-dysentériques, mentionnées par lui et qu'il a trouvées jusqu'à 1 : 50 chez des infections par le SHIGA.

LENTZ, de même se basant aussi sur les chiffres d'autrui, décrète qu'un sérum non-dysentérique agglutine le SHIGA jusqu'à 1 : 40 au maximum, les non-toxiques jusqu'à 1 : 80, de sorte qu'une agglutination 1 : 50 serait concluante pour l'infection par le SHIGA et au moins 1 : 100 pour les types non-toxiques. Mais le travail de LENTZ fait voir clairement qu'il estime l'agglutination comme un moyen bien pauvre pour séparer les types, même en ce qui concerne la séparation du bacille de SHIGA des autres, quoiqu'il ne se serve point de l'agglutination par des sérums normaux pour appuyer son opinion.

RUGE cite les données de LENTZ concernant l'agglutination par des sérums normaux dans des dilutions de 1 : 30 jusqu'à 1 : 50. Selon lui ce phénomène peut conduire à des conclusions fautives quand on se sert d'un faible sérum de SHIGA.

Les sérums de FLEXNER et de Y d'ordinaire n'agglutineraient pas le SHIGA. Les agglutinations de 1:50 chez le SHIGA et de

1:100 chez le FLEXNER ou le Y estime-t-il des symptomes suspects de dysentérie.

HEIHEWERTH a trouvé que les bacilles récemment isolés de ses recherches furent agglutinés par les sérums des malades dans des dilutions de 1:100 jusqu'à 1:500. Il ne mentionne point l'action des sérums d'hommes sains.

Quant à l'agglutination par les sérums de non-malades KUENEN se tient aux résultats des autres auteurs. Il dit qu'un antigène conservé est de moindre valeur qu'un fraiche preparé de bacilles vivants. Néanmoins il a obtenu souvent une agglutination de 1:250 jusqu'à 1:500 chez le SHIGA et de 1:100 jusqu'à 1000 chez le Y. Plusieurs fois l'agglutination était positive chez un examen bactériologique négatif, dans d'autres cas l'agglutination était négative quoique le bacille d'Y fût isolé. Aussi dans des cas de dysentérie par le bacille de FLEXNER il a trouvé une agglutination de 1:250 jusqu'à 1:500.

L'agglutination n'a qu'un intérêt relatif pour la diagnose, quoiqu'elle puisse donner des indications dans des cas d'épidémies. Quand à la valeur pour la diagnose de l'infection par le bacille de SHIGA, KUENEN partage l'opinion des autres auteurs.

A propos des agglutinations par des sérums normaux il est intéressant ce que KUENEN dit sur le type VAN DEN BOSCH isolé par lui. Ce microörganisme possède les qualités cardinales des bacilles dysentériques, s'approche du FLEXNER en ce qui concerne la formation d'indol, mais ne fait pas fermenter la mannite. *Des suspensions de ces bactéries furent agglutinées par le sérum d'hommes parfaitement sains*, ce qui KUENEN fait dire qu'il n'est pas encore certain, qu'on à affaire à une bactérie dysentérique vraie. Mais on se demande alors s'il n'est pas nécessaire de dire précisement ce que sont en effet des bactéries dysentériques *vraies*. En tout cas KUENEN se prononce nettement sur la valeur du sérodiagnostic. Parlant du schème à sucres de LENTZ il dit: »Néanmoins ce schème est indis»pensable à la séparation des bacilles de SHIGA-KRUSE des »autres types. Pour la séparation des types non-toxiques entre»eux il n'est que partiellement utile et les réactions sérologiques »sont nécessaires«.

Suivant JOCHMANN 15) le sérum des malades possède souvent dans les périodes ultérieures de la maladie et pendant la recon-

valescence des valeurs agglutinantes très élevées; des dilutions de 1 : 500 jusqu'à 1 : 1000 sont encore assez souvent positives. Avec LENTZ il estime que 1 : 50 est concluant pour le SHIGA, 1 : 100 pour le FLEXNER et pour le Y. Cette exigeance dans le cas dernier est provoquée par l'agglutination du sérum normal qui est de 1 : 30 jusqu'à 1 : 50.

DOPTER et SACQUÉPÉE acceptent l'agglutination spécifique, aussi par le sérum des malades, notamment dans les cas graves, tandis que le sérum des sains et des malades non-dysentériques comme règle n'agglutine pas. Ils ne donnent pas de chiffres.

REMLINGER et DUMAS mentionnement une agglutination de sérum normal de 1 : 10 jusqu'à 1 : 25, de malades de 10 jours de 1 : 50 jusqu'à 1 : 100, quel titre est montant pendant la reconvalescence. Cependant, ils parlent aussi d'une agglutination par du sérum normal de 1 : 50 pour le FLEXNER; on s'approche ainsi de l'agglutination par le sérum des malades.

PRIBRAM et HALLE constatent que souvent le sérum normal agglutine les bacilles peu-toxiques, tandis que la méthode de CASTELLANI ne conduit pas à des résultats. L'agglutination par le sérum des malades trouvent-ils souvent assez basse, c'est-à-dire 1 : 200, rarement plus élevée, par exemple dans la troisième semaine de la malade parfois 1 : 640. On voit qu'aussi dans ce cas l'agglutination par du sérum normal joue un rôle sans qu'on en parle plus.

Préparé par les résultats obtenus concernant le sérum normal de lapin nous pouvions expecter des agglutinations élevées par le sérum de personnes ne souffrant pas de dysentérie.

Quant au sérum des malades nous trouvions le suivant:

Le sérum d'un malade qui nous avait fourni le bacille *2* (*1114*) agglutinait 26 jours après le commencement de la maladie ce bacille 1 : 288, mais agglutinait plus fortement le bacille de laboratoire FLEXNER-*Amsterdam*. Le sérum des malades *4* et *5* de l'endémie de *Leyde* agglutinait le bacille *5* respectivement 1 : 1600 et à 1 : 800. L'agglutination du bacille *5* par le propre sérum était donc inférieure. Les sérums avaient été pris pendant la reconvalescence 28 jours après le début de la maladie. Aussi le sérum d'autres malades de la même endémie, mais qui avaient fourni d'autres microbes, fut ajouté au bacille *5*.

L'agglutination était de 1:800 au maximum. Ce titre fut atteint par le sérum du malade qui avait fourni le bacille *7* (HARTEVELD) et qui différait des bacilles *4* et *5* (voir: plus tard). Il est difficile à constater si dans ce cas il existe de l'agglutination du propre bacille, ou bien para-agglutination d'un bacillle qui avait participé secundairement à l'infection. Les autres sérums de l'endémie au nombre de deux, agglutinaient le bacille *5* seulement 1:400. Le sérum de la malade qui avait fournie le bacille *6* (LOBBE) agglutinait *5* (BOGAERDE) 1:200. De sorte que les agglutinations 1:400 pourraient être encore la suite de l'endémie si un sérum normal, à dire celui de M. KAPSENBERG, n'avait pas agglutiné le même bacille 5 à un titre de 1:400. Ce fait faisait penser de nouveau à l'agglutination non spécifique par le sérum normal.

De telles expériences sur l'agglutination furent executées avec les mêmes sérums en se servant du bacille 9 (FLEXNER, *Amsterdam*) comme antigène. A ce moment ce bacille avait subi déjà beaucoup de passages au laboratoire. Seulement pendant les recherches concernant les cas de dysentérie on a découvert qu'il différait du FLEXNER ordinaire par la non-formation de l'indol et la coagulation retardée du lait. Le résultat de l'agglutination fut à peu près le même comme chez le bacille 5, seulement l'agglutination 1:800 avec le sérum du malade *7* (HARTEVELD) manquait; celle ci n'allait que jusqu'à 1:400 tandis qu'un autre sérum de l'endémie allait à ce moment jusqu'à 1:800, et le sérum normal de M. KAPSENBERG de nouveau à 1:400. Si l'on veut déduire des conclusions de toutes ces agglutinations on pourrait dire que les bacilles *5* et *9* seront probablement identiques. Le tableau suivant donne le résumé des agglutinations par M. KAPSENBERG.

4. Agglutination avec du sérum humain normal et malade.

Sérum de	Antigène de bacille 5						Antigène de bacille 9 (Amsterdan					
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/16
HARTKAMP (bacille 4)..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BOGAERDE (bacille 5)..	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
POELSTRA) bacilles de	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—
BONGAARDS) l'endémie.	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
LOBBE (bacille 6).....	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—
HARTEVELD (bacille 7).	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—
KAPSENBERG (normal)..	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—

L'agglutination élevée avec le sérum normal (1 : 400), devenait la cause d'un nombre d'agglutinations avec des sérums normaux tant que cette normalité était acceptable. On pouvait obtenir de tels sérums assez facilement en se servant des sérums qui avaient été envoyés pour être examinés avec la réaction syphilitique de WASSERMANN. D'ailleurs ils furent pris maintes fois spécialement pour le but indiqué. Un examen plus spécial fut executé à cet égard par M. VAN MANEN, médecin militaire et élève des cours propicaux à Leyde. Le bacille SHIGA présentait aussi dans ce cas quelques difficultés parce l'antigène aussi clair qu'il fut préparé, précipitait souvent d'une manière ressemblant l'agglutination. Les contrôles avaient lieu après 24 heures mais parfois le résultat était déjà évident après $4^1/_2$ à $5^1/_2$ heures.

Le tableau suivant donne un aperçu des résultats obtenus en employant 20 sérums, qui ne donnaient pas tous la même agglutination. Dans le tableau la plus forte agglutination fut notée jusqu'à un maximum de 1 : 800. Il en résulte que même les bacilles STRONG et Y ne peuvent pas se soustraire à l'agglutination par un sérum normal, soit-il peut-être partiellement la suite des passages prolongés dans le laboratoire.

5. Agglutination par du sérum normal.

	Bacille examiné.	Agglutination maximale.	Controlé:	Remarques.
1	Bacille MEUTSTEGE.....	1 : 800	avant 24 heures	
2	„ *1114*.....	1 : 800	„ 24 „	
3	„ *1408*.....	1 : 800	„ 24 „	
4	„ HARTKAMP.....	1 : 800	„ 24 „	
5	„ BOGAERDE.....	1 : 800	„ 24 „	
8	„ *1499*-ENDEGEEST ...	1 : 600	au bout de 24 heures	
9	„ FLEXNER-*Amsterdam*	1 : 800	avant 24 „	
10	„ SHIGA-KRUSE.....	1 : 800	„ „ „	agglutination spontanée
11	„ Y.....	1 : 400	au bout de 24 „	
12	„ STRONG-H.....	1 : 600	„ „ 18 „	
13	„ STRONG-K.....	1 : 600	„ „ 24 „	

Quand on construit un tableau mentionnant les résultats des agglutinations avec du sérum de malades et de reconvalescents

et avec du sérum normal, prenant une dilution maximale de 1 : 500, laquelle suivant la plupart des auteurs est concluante pour la dysentérie, on obtient une compréhension bien nette de l'agglutination normale gênante de la même façon comme chez les agglutinations avec du sérum normal de lapin.

Nous avions eu à notre du position les sérums suivants: *1114* (bacille *2*), HARKTAMP (bacille *4*), BOGAERDE (bacille *5*), LOBBE (bacille *6*), HARTEVELD (bacille *7*) et ENDEGEEST (bacille *8*). Avec tous ces sérums on agglutinait 1 : 500, de même qu'avec du sérum normal, et l'expérience fut fréquemment repetée pour exclure des erreurs. D'abord les recherches furent executées par le Dr. BOS, plus tard par M. KUYK. La réaction fut lue après 24 heures et le résultat est montré dans le tableau suivant:

6. Agglutination 1 : 500 avec du sérum humain malade et sain.

Bacille examiné.	Sérum normal 1 : 500	Sérum 1114 1 : 500	Sérum HART-KAMP 1 : 500	Sérum BO-GAERDE 1 : 500	Sérum LOBBE 1 : 500	Sérum HARTE-VELD 1 : 500	Sérum ENDE-GEEST 1 : 500
1 Bacille MEUTSTEGE.....	±	+	+	+	+	+	+
2 „ *1114*.....	+	+	+	+	+	+	+
3 „ *1408*.....	+	+	+	+	+	+	+
4 „ HARTKAMP.....	+	+	+	+	+	+	+
5 „ BOGAERDE.....	+	+	+	+	+	+	+
6 „ LOBBE.....	—	—	—	—	—	—	—
7 „ HARTEVELD.....	—	—	—	—	—	—	—
8 „ *1499*-ENDEGEEST.	±	—	—	—	—	—	—
9 „ FLEXNER-*Amsterdam*.....	+	+	+	+	+	+	+
10 „ SHIGA-KRUSE....	±	+	—	—	—	—	—
11 „ Y.....	±	—	—	—	—	—	—
12 „ STRONG-H.....	±	—	—	—	—	—	—
13 „ STRONG-K.....	±	—	—	—	—	—	—

Il en résulte que les bacilles LOBBE, HARTEVELD et *1499*, qui se distinguent bien des bacilles dysentériques, ne sont agglutinés par aucun des sérums malades. La même particularité est valable pour les bacilles Y et STRONG dont nous savons cependant (voir: le tableau précédent) que parfois ils peuvent être agglutinés. Le 1499 n'est pas agglutiné par son propre sérum ; le SHIGA parfois par du sérum normal et aussi par le sérum-1114.

Mais les bacilles 1, 2, 3, 4, 5 et 9 ne sont pas à reconnaître par cette agglutination 1 : 500, et d'ailleurs agglutination n'est pas d'accord avec les résultats de M. KAPSENBERG et mentionnés page 30. Dans ce dernier cas le sérum LOBBE n'agglutinait pas 1 : 500, à ce moment le (même) sérum le faisait bien.

De tous les faits mentionnés il est a conclure que les données fournies par l'agglutination en cas de dysentérie ne représentent que de très faibles preuves quant à la spécificité, et qu'on doit tenir compte notamment des agglutinations élevées par du sérum normal.

Dans la littérature on n'insiste que très peu à cette exigeance, qui s'applique au sérum normal de lapin comme à celui de l'homme. Qu'elle serait seulement appliquable au bactéries isolées à *Leyde* ne peut pas être accepté parce que le phénomène s'est montré aussi chez les bacilles SHIGA, STRONG et Y. En conséquence il était un travail bien appréciable de SNIJDERS 16) de tirer l'attention à ce point, et de stipuler qu'il est dangereux de conclure à des infections dysentérique latentes ou abnormales quand on trouve une agglutination de 1 : 100 ou plus haut des bacilles de FLEXNER ou de Y.

Dans ses propres recherches SNIJDERS trouva les agglutinations avec le sérum humain normal souvent jusqu'à 1 : 100, parfois jusqu'à 1 : 250, et il en tire le conclusion suivantes:

»Le jugement précis des résultats des agglutinations des »bacilles dysentériques avec des sérums humains est difficile, »parce que:

»a. prèsque tous les sérums dites »normaux« agglutinent les »suspensions des bacilles dysentériques, parfois très fortement.

»b. les sérums des malades dysentériques très souvent ne »possèdent pas une puissance agglutinatoire plus active à l'égard »des bacilles dysentériques que les sérums normaux.

»La même hauteur du titre agglutinatant, semble-être atteint »par de différentes causes, spécifiques comme non-spécifiques, »et dans la plupart des cas il est bien difficile de décider quel »est le part de chacunes d'entre elles«.

Je suis d'opinion que moi aussi je peux soutenir ses conclusions, notamment en ce qui concerne les bacilles isolés a *Leyde*, avec ces réserves, que je regarde les titres agglutinants

des sérums humains normaux beaucoup plus élevés que ne le fait SNIJDERS. En effet les titres normaux des sérums normaux d'homme et de lapin peuvent être très considérables.

IV. Nature des bacilles trouvés à Leyde.

La critique de la nature des bacilles trouvés à *Leyde* se fait le plus facilement à l'aide du tableau de page 35.

Les bacilles 1, 2, 3, 4 et 5 furent considérés comme des bacilles de FLÉXNER jusqu'au moment où la non-formation d'indol et la coagulation retardée et singulière du lait avec secrétion de peu de lactor-sérum attirait l'attention. Une orientation par la comparaison avec les caractères du bacille FLEXNER de laboratoire (bacille *9 Amsterdam*) ne donnait pas de succes parce que celui-ci prouvait être identique à nos propres bacilles. Si ces derniers n'étaient pas des FLEXNER, aussi celui d'*Amsterdam* ne l'était pas à moinsqu'il ne fût varié, eût perdu sa puissance de former l'indol et acquis celle de coaguler le lait. A ce moment je ne possède pas d'autres bacilles de FLEXNER pour pouvoir faire la comparaison. Peut-être nos bacilles sont les mêmes qui celui de BAERTHLIEN (voir: page 10). Il est un fait que ces bacilles peuvent causer des cas cliniques de dysentérie, et aussi des endémies.

Probablement nos bacilles sont aussi identiques au bacille D'HÉRELLE de l'épidemie de BERTILLON, lequel pourtant ne coagule pas le lait et n'est pas agglutiné par le sérum de SHIGA et de Y. Sous ce respect il était autre que notre bacille.

Bien remarquable est le bacille 1499, provenant de cas de l'hôpital ENDEGEEST, qui par ses qualités bactériologiques ressemble au SHIGA-KRUSE, s'en part par la formation d'indol, et n'est pas avirulent à l'égard des lapins; il se rapprôche alors du bacille trouvé en ARGONNE par REMLINGER et DUMAS. Ils en disent qu'ils ont isolés deux types qui formaient de l'indol, ne fermentaient pas la lactose, la mannite, la maltose et la saccharose, n'étaient pas agglutinés par le sérum de SHIGA ou d'autres sérums, pas plus que par le propre sérum. Ce dernier donna bien une fixation d'alexine positive avec le propre bacille, avec le SHIGA, le FLEXNER, le HISS aussi avec l'autre type de l'ARGONNE (Y).

Bacille examiné.	Mobilité	Indol suivant Ehrlich	Coagulation du lait	Gaz en glucose	Gaz en lactose	Gaz en saccharose	Fluorescence en rouge-neutre	Acide en glucose	Acide en saccharose	Acide en mannite	Acide en maltose	Culture sur Endo	Culture sur Drigalski-Conradi	Vert de malachite I	Vert de malachite II	Provenance
1. Meutstege.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	non-colorée	bleue	coagulation sans gaz	inaltéré	Leyde
2. *1114*.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	idem	idem	idem	idem	Leyde
3. *1408*.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	idem	idem	idem	idem	Leyde
4. Hartkamp.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	idem	idem	idem	idem	Leyde
5. Bogaerde.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	idem	idem	idem	idem	Leyde
6. Lobbe.....	—	+	+	—	—	—	+	+	+ ?	+	+	rouge	rouge	idem	coagulation sans gaz	Leyde
7. Harteveld.....	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	rouge	rouge	idem	coagulation sans gaz	Leyde
8. *1499*.....	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	non-colorée	bleue	idem	inaltéré	Leyde
9. Flexner-*d'Amsterdam*.....	—	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	idem	idem	idem	idem	Amsterdam
10. Shiga-Kruse.....	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	idem	idem	idem	idem	Amsterdam
11. Y.....	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	idem	idem	idem	idem	Utrecht
12. Strong H.....	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	idem	idem	idem	idem	Amsterdam
13. Strong K.....	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	idem	idem	idem	idem	Amsterdam

Quant aux fixations de l'alexine nous n'avons pas poursuivi cette réaction assez loin. Mais nos résultats étaient jusqu'à maintenant toujours *négatifs*, de sorte qu'il n'est plus possible de comparer avec le type de l'ARGONNE. Ce type était pathogène pour des cobayes et des lapins, tandis que des cultures tuées faisaient tomber malades des lapins.

Notre bacille 1499 tuait un lapin après infection entraveineuze de 1 c. c. suspension de culture, ainsi une dose très forte, en 7 jours. Les cultures des organes restaient stériles. Des lapins inoculés dans le péritoine ou par voie sous-cutanée étaient encore vivants après 10 jours.

Plus tard l'homme qui avait fourni la culture obtenait une rechute, et le bacille fut cultivé de nouveau des excréments. Avec ces cultures-ci les expériences chez des lapinsav aient un résultat négatif.

Si notre bacille 1499 est probablement identique au second type de l'ARGONNE, il est prèsque sûrement le même que le bacille décrit dernièrement par SCHMITZ et isolé dans un camp de prisonniers militaires où 815 personnes étaient tombées malades. On isola un bacille qui était à peu près innocent pour des animaux et qui montrait précisément les mêmes caractères que notre bacille. Le travail de SCHMITZ est très détaillé et fait voir encore une fois de plus que l'agglutination forme une méthode bien incertaine pour différencier les bacilles dysentériques.

Que penser des bacilles *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD), isolés en même temps que les bacilles de l'endémie de l'hôpital académique? Ils se rapprochent du colibacille ou plutôt du bacillus aérogenes parce qu'ils forment l'indol, coagulent le lait, font fluorescer le rouge-neutre, mais s'en éloignent par la non-formation de gaz en glucose, lactose et saccharose, tandisque qu'ils forment de l'acide dans ces sucres, et de cette manière font changer de couleur les milieux de DRIGALSKI et de ENDO. Mais aussi la conduite en vert de malachite I et II de LÖFFLER est differente de celle du colibacille et de l'aérogenes.

Si l'on considère que la même endémie avait fourni le bacille de *Leyde*, qui avait été observé aussi ailleurs; que les bacilles 6 (LOBBE) et 7 (HARTEVELD) se tenaient tout-à-fait différent et négatifs en ce qui concerne l'agglutination, il est bien probable qu'ils sont innocents à l'endémie.

Cependant la littérature nous dit que de tels bacilles différents

des bacilles dysentériques ont été considérés à plusieurs reprises comme la cause de dysentéries vraies, ce qui ne diminue point l'étiologie spécifique de la dysentérie bacillaire. On peut penser sous ce rapport aux soi-disants bacilles pseudo-dysentériques mobiles et immobiles isolés par NÈGRE (18) en Algérie (NÈGRE appelle seulement le SHIGA-KRUSE et le FLEXNER de véritables bacilles dysentériques). Aussi, parlant des bacilles *6* (LOBBE) et *7* (HARTEVELD) on doit se rappeler le travail de SELIGMANN (19) qui, se basant notamment sur l'agglutination, aussi avec des sérums de lapin préparés avec des bacilles inagglutinables, conclut à toutes sortes de déviation de culture et d'agglutination qui néanmoins n'empêcheraient pas que des bacilles dysentériques atypiques seraient bien de véritables causes d'une dysentérie vraie. Par voie de transition lente il serait possible d'obtenir une liste commençant par le coli et finissant avec le SHIGA. Et il serait notamment possible d'isoler de tels passages dans des épidémies ou endémies fraîches.

Pour eux qui acceptent cette possibilité de variation précipitée nos bacilles *6* et *7*, LOBBE et HARTEVELD, étaient donc bien d'un réel intérêt dans l'endémie que nous acceptons comme causée par le bacilles *4* et *5*, HARTKAMP et BOGAERDE, et suivant eux tous ces bacilles peuvent être très parents l'un de l'autre d'un point de vue phylogènique.

Encore quelques mots sur les bacilles de laboratoire, provenant d'autres instituts et dont nous adresson nos remerciments aux donateurs. Le bacille SHIGA était très typique, surtout aussi en ce qui concerne l'action toxique vis-à-vis des lapins.

Le bacille FLEXNER était, il est répété déjà plusieurs fois, tout à fort identique aux bacilles isolés par nous et considéré comme des FLEXNER. Il faisait coaguler très lentement le lait et ne formait pas d'indol.

Les deux bacilles de STRONG ne faisaient pas fermenter la saccharose, étaient à ce point des bacilles Y, et aussi en ce qui concerne l'agglutination. Mais il formaient de l'indol, ce qui ne faisait point le Y. Ces bacilles comme le SHIGA étaient sensibles à l'agglutination normale.

Cependant on ne doit pas oublier que de tels bacilles cultivés pendant un certain temps dans le laboratoire peuvent obtenir des caractères atypiques.

V. Conclusions.

1°. Dans des cas de dysentérie en *Hollande* qui peuvent posséder un caractère endémique on peut isoler une bactérie dysentérique qui ressemble au bacille de FLEXNER mais s'en diffère par la non-formation d'indol et la coagulation retardée du lait on se forme la lacto-sérum très tard. En comparant avec un bacille FLEXNER d'*Amsterdam* ce dernier prouvait avoir les mêmes caractères. Si le bacille trouvé n'est pas un FLEXNER il est probablement identique au bacille de BAERTHLEIN et peut-être aussi à celui de D'HÉRELLE.

2°. En examinant des bacilles dysentériques par la méthode de l'agglutination par des sérums spécifiques de lapins ou par des sérums des hommes malades, on doit tenir compte des agglutinations possibles à titre élevé des sérums soi-disant *normaux* lesquelles respectivement peuvent surpasser 1 : 1200 et 1 : 500.

3°. Dans une petite endémie à Leyde le bacille isolé des excréments d'un malade possédait des caractères atypiques et était bien probablement identique au second type de l'ARGONNE de REMLINGER et DUMAS et prèsque certainement identique à celui de SCHMITZ.

LITTÉRATURE.

1. SPRONCK. Onderzoekingen naar de aetiologie der acute dysenterie in Nederland. Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde, 1902, 38ste deel, blz. 896.

2. KUENEN. De bacillaire dysenterie en haar optreden in Deli. Gen. Tijdschrift voor Ned.-Indië, deel 55, afl. 3, 1915, bladz. 203.

3. LENTZ. Dysenterie. Handbuch der pathogenen Mikro-organismen von Kolle und Wassermann, 2te Aufl., III Bd., 1913.

4. LÜDKE. Die Bazillenruhr, 1911, Gustav Fischer, Jena.

5. HEHEWERTH. Over dysenterie-bacillen en de indeeling in groepen. Gen. Tijdschrift voor Ned.-Indië, 1916, deel 56, afl. 4, blz. 470. Verslag van het Centraal Laboratorium voor de Volksgezondheid over 1915.

6. Baerthlein. Ueber neuere bakteriologische Befunde bei Ruhrerkrankungen. Berliner Klinische Wochenschrift, 15 April, 1912.

7. D'Hérelle. Sur un bacille dysentérique atypique. Annales de l'Institut Pasteur, mars, 1916.

8. Kruse (und Matthes). Ueber die Ruhr. Verhandlungen des Deutsches Kongresses für innere Medizin in Warschau, 1916. Wiesbaden, J. F. Bergmann.

9. Dopter et Sacquepée. Précis de bactériologique. Bibliothèque de Gilbert et Fournier, Paris, Bailliere et Fils, 1914.

10. Ruge. Bazillenruhr. Handbuch der Tropenkankheiten von C. Mense, 2te Aufl., III Bd., 1914, Ambrosius Barth, Leipzig.

11. Remlinger et Dumas. La dysentérie en Argonne. Annales de l'Institut Pasteur, août, 1916.

12. Nicolle, Debains et Loiseau. Etudes sur le bacille de Shiga. Annales de l'Institut Pasteur, février, 1917.

13. Debains. Sur les bacilles du groupe Flexner-Y. Annales de l'Institut Pasteur, février, 1917.

14. Pribram und Halle. Neuere Ergebnisse der Dysenterieforschung. Ergebnisse der Hygiene u. s. w. von Weichardt, II Band, 1917, Berlin, Julius Springer.

15. Jochmann. Lehrbuch der Infektionskrankheiten, 1914, Berlin, Julius Springer.

16. Snijders. Over de beteekenis der agglutinatie van dysenteriestammen met menschensera. Gen. Tijdschrift voor Ned.-Indië, 1916, Deel 56, afl. 2, bladz. 105.

17. Schmitz. Een neuer Typus aus der Gruppe der Ruhrbacillen als Erreger einer grösseren Epidemie. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 44 Bd., III Heft, 1917.

18. Nègre. Recherches sur les bacilles pseudo-dysentériques au point de vue de leurs affinités avec les bacilles dysentériques et le Bacterium coli. Annales de l'Institut Pasteur, avril, 1917.

19. Seligmann. Zur Bakteriologie der Ruhr im Kriege. Central blatt für Bakteriologie, Originale, 79 B., Heft 2, 1907.

From the Laboratory of „ANT. JURGENS' Margarine Works" Oss.

RESEARCHES ON AND MEANS TO PREVENT RANCIDITY OF VEGETABLE MARGARINE [1])

BY

H. C. JACOBSEN.

The great improvements in the methods of refining oils and fats enabled the margarine-industry to use oils, formerly employed for technical purposes only, such as cocoa nut oil, palm kernel oil, etc. as elements for the manufacture of margarine.

Consequently these oils began to take an important place among the articles of food and the well-known and much appreciated vegetable margarine came into existence.

Very soon however, the difficulty arose that vegetable margarine in hot weather was liable to go bad; this was noticeable by a strong odour viz. that of rancid cocoa nut oil.

This rancidity often occurred and was a serious disadvantage to the vegetable margarine-industry. Though the cause was unknown, practical experiments were made to prevent this rancidity by adding preservatives. These experiments proved unsuccesful, as the rancidity returned regularly every year.

In order to be able to remove this drawback succesfully we first of all tried to detect the cause. It is a well-known fact that oils and fats are substances subject to various influences of light, air and moisture, which may make the oils unfit for consumption.

---

[1]) Extract from: Onderzoekingen betreffende het ransig worden van plantenboter en de middelen ter bestrijding. Uit het Laboratorium van „ANT. JURGENS' Margarinefabrieken" te Oss, door H. C. JACOBSEN, Nijmegen, 1918.

Decomposition of oils and fats is usually caused by „hydrolysis", viz. the formation of fatty acids and glycerine. This may be caused by:

1. the action of chemicals (alkalis, acids, etc.),
2. the action of enzymes,
3. a microbial influence.

Various opinions prevail in the voluminous literature on the true cause of rancidity of fats, which opinions cannot be expatiated upon in this treatise. Chiefly they come to this: the rancidity is ascribed to the influence of divers factors such as the presence of the oxygen in the air, of moisture, the influence of light or of chemicals, or combinations of all these factors.

In many cases oils and fats under the influence of oxidation get a sharp odour and taste, known by the name of „rancid" and this is especially so when the oils contain water and are placed in the light. This we can call a purely chemical change.

It has been discovered that with the rancidity of vegetable margarine we have to deal with a *microbiological* process, similar to that described for pure butter by ORLA JENSEN [1]). The rancidity of vegetable margarine, containing cocoa nut oil or palm kernel oil and also of pure butter, is recognised by a typical ester odour appearing as soon as the margarine begins to go bad. At the time the rancid odour occurs — and this may be taken as the best test for rancidity — a great change of taste is observed; the flavour becomes disagreeable, caused through the formed ester products and the free fatty acids which always arise when rancidity occurs.

From experience we know that especially those fats containing volatile fatty acids (cocoa nut oil, palm kernel fat and butter fat) show this form of rancidity.

For a long time the amount of free butyric acid was considered a measure for the degree of rancidity of butter. This opinion however is not correct, seeing that a fat may contain free volatile fatty acids without being rancid.

JENSEN was the first to study rancidity of pure butter and succeeded in detecting its causes.

Briefly his results are the following:

---

[1]) JENSEN, O. Centralbl. f. Bakteriologie, 2e Abt. Bd. VIII, 1902. S. 11, etc.

The atmosphere plays only a direct part in the rancidity of butter when sunlight or an elevated temperature co-operate at the same time. The butter becomes oxidised and this leads to a disagreeable taste and odour but the butter does not become rancid.

Butter only becomes rancid through the action of certain micro-organisms. As it is necessary for the organisms to have air for their development, the process sets in at the surface of the butter when in contact with air, and afterwards affects the remainder.

JENSEN considers the presence of *Cladosporium butyri* the principal factor which causes rancidity. This is a mould which gives rise to the highest degree of rancidity, and especially so when in co-operation with a few other organisms e. g. *Oidium lactis*. Cladosporium butyri splits butterfat, thereby producing volatile fatty acids and certain esters which latter are the chief characteristics in rancidity.

JENSEN further points out the danger of infection of butter through impure water and through germs in the atmosphere. He recommends a few means which may prevent rancidity.

As to the preserving of butter and margarine the researches of FISCHER and GRUENERT [1]) are of importance. They made a special study of the preservative influence of some substances (benzoic acid, hydrin, salicylic acid, boric acid) — in comparison to salt — on butter and margarine and recorded the chemical changes peculiar to rancidity. Though their researches are very important we cannot agree with their inference that rancidity cannot be prevented by the addition of preservatives other than salt. In fact we have come to the very opposite conclusion.

Though JENSEN had defined the cause of the rancidity of genuine butter, that of vegetable margarine was until recently unsolved. Consequently no one had succeeded in preventing large quantities of margarine from going bad in summertime.

As to the constancy of cocoa nut oil and palm kernel oil in relation to the various influences which may play a part in

---

[1]) FISCHER, K. und GRUENERT O. Ueber den Einfluss einiger Konservierungsmittel auf Haltbarkeit und Zusammensetzung von Butter und Margarine. Zeitschr. f. d. Unters. d. Nahr. u. Genussmittel Bd. XXII, 1911, S. 553.

the rancidity of oils (the oxygen of the air, light, moisture, enzymatic substances, chemicals), it was shown in a preliminary examination that the action of water and air in the dark even at a high temperature (40° C) was of no importance; the flavour odour and acid value were only slightly changed. As soon as light co-operates however, a distinct change can be observed; the flavour and odour become acrid and disagreeable, whilst the acid value increases very slightly. These changes are still more noticeable when small quantities of acid (sulphuric acid) or oxidising substances (iron chloride or hydrogen peroxide) are added to the cocoa nut oil. Through the action of pancreas- or castor seed lipase cocoa nut oil soon undergoes an important splitting operation, noticeable by the odour of lower fatty acids. Under the simultaneous action of hydrogen peroxide and lipase, especially when free acid is added, a very sharp and disagreeable odour in caused, which reminds one of aldehydes or pyrouvic acid.

During all these experiments however, the typical rancidity of cocoa nut oil did not occur. Here we have to deal with oxidation processes, which may be accelerated by emulsifying cocoa nut oil with a solution of agar-agar to which the above mentioned substances have been added. The large surface of the fine fatty globules cause a quickened oxidation. Similar changes may also be observed in all sorts of other fats and oils and in this respect cocoa nut oil and palm kernel oil are no less constant.

Experiments showed that the well-known ester odour of rancid cocoa nut oil appears only when it is subject to the influence of microbes. It is easy to demonstrate this by exposing to the air for some time a solid nutrient medium consisting of agar-agar in which cocoa nut oil has been emulsified, or by inoculating it with soil. After a few days several colonies of microbes (yeasts, moulds, bacteria) develop on such plates and at the same time the smell of rancid cocoa nut oil can be observed. On closer examination they appear to be only moulds which in pure culture are apt to render cocoa nut oil rancid.

Therefore a clear distinction ought to be made between this form of rancidity and the one caused by oxidation under the influence of light.

In order to trace the microbes which render cocoa nut oil and palm kernel oil rancid, as well as vegetable margarine prepared from these oils, a number of samples of these oils and margarine was subjected to a bacteriological examination. This revealed that the oils themselves may turn rancid through the action of moulds, when the oils contain small quantities of water (0.2—0.5 %). The origin of the oils or the methods of preparing and refining them appeared to have no influence. Rancid samples showed as a rule a higher percentage of fatty acids. Sometimes however these percentages gradually diminish.

Next a few samples of vegetable margarine, rancid as well as fresh, were examined. This examination proved again that rancidity coincides with a higher percentage of fatty acids and further that rancidity first appears on the surface of butter, where it is exposed to the atmosphere. Only later on does this rancidity permeate the remainder. The number of microbes found in one gram of vegetable margarine turned out to be considerable (100.000—18.000.000). Torulas, moulds and bacteria (mostly micrococci) were chiefly found.

In this experiment the culture-plates of EYKMAN [1]) were used, which through the presence of a thin layer of fat underneath the nutrient agar enable us to discover the fatsplitting microbes at once. At the same time cultures were made on agar-plates in which a mixture of cocoa nut oil and pressed tallow had been emulsified. The latter culture media, after being inoculated with rancid margarine, very soon showed rancidity of the cocoa nut oil contained in them.

Several microbes (isolated from fat- and margarine-samples) including Torulas, Micrococci, Bacteria, Bacils and Moulds were examined for their capacity to render cocoa nut oil rancid. Only the following moulds were proved to have this capacity: Penicillium glaucum, Aspergillus spec., Aspergillus niger, Clasterosporium spec., Hormodendron spec., Phoma spec., Mucor spec., and Cladosporium butyri. We may mention that Oidium lactis, though a strong fat-splitting organism, does not cause rancidity.

Especially Penicillium glaucum and the yeastlike mould Cla-

[1]) EYKMAN, C. Centralbl. f. Bakteriologie, 1 Abt., 1901, Bd. 29, S 841.

dosporium butyri described by JENSEN, appeared to be of the greatest significance in cases of rancidity. These moulds can be easily found in rancid vegetable margarine by means of the spots shown thereon. These spots are caused by colonies of moulds which affect the fat locally. Usually they are easily recognised under the microscope, especially when the fat contained in the affected parts has been extracted with ether beforehand.

In order to confirm the above facts, vegetable margarine (salted and unsalted) prepared from sterilised constituents was inoculated in glass dishes with the pure culture of the isolated microbes and combinations of them. These experiments showed the rapidity with which rancidity was brought about especially under the simultaneous influences of Cladosporium butyri, Penicillium glaucum and Oidium lactis. After five days the samples were undoubtedly rancid and after about seven weeks the percentage of fatty acids of the oil in some cases was found to be about 10 % (calculated to oleic acid). It was further proved that the influence of these moulds on absolutely dry cocoa nut oil is of no significance whatever, whereas only slight traces of water are needed to cause rancidity.

This settled without a doubt that the cause of rancidity of vegetable margarine must be looked for in the presence and the development of certain kinds of moulds. The preventative means which may be applied are:

1. avoidance of spores of moulds which infect vegetable margarine during its manufacture,

2. effectual suppression of the development of germs by adding preservatives, as these germs in spite of the utmost care and cleanliness may get into the margarine.

Whilst the former must never be lost sight of, the latter remains the only effective means.

The action of a number of preservatives on the development of the most frequent moulds (Penicillium glaucum, Cladosporium butyri, Oidium lactis) was examined.

The following preservatives were used: common salt, sodium formiate, kalium nitrate, sodium sulphate, sodium- and magnesium-lactate, lactic acid, benzoic acid, benzoate of sodium, boric acid, borax, o. toluylic acid and cinnamic acid.

Common salt proved more preferable to other salts; alkaline

salts as magnesium lactate have a stronger antiseptic effect. Lactic acid, together with common salt, hinders the development of moulds though not to a great extent.

A solution of 0.1 % benzoic acid prevents the growth of moulds; with 15 % of common salt 0.05 % is sufficient.

Sodium benzoate has much less preservative effect; 2 % is not sufficient to suppress the growth of Penicillium and Cladosporium completely; when 15 % of common salt is added however, 0.5 % suffices.

Boric acid is an effective poison for Penicillium and Oidium but not for Cladosporium. This latter develops fairly well in solutions with 10 % of salt and 2.5 % of boric acid.

Borax is a much better preservative than boric acid owing to its alkaline reaction. Cladosporium does not grow in solutions with 10 % of salt and 0.1 % of borax.

o. Toluylic acid as a preservative is inferior to benzoic acid, whereas cinnamic acid proved to be a strong poison for Cladosporium; it is not so strong however for Penicillium.

As in practice only benzoic acid, sodium benzoate, boric acid and borax come into consideration as preservatives, these were subjected to further examination.

This brought to light that *vegetable margarine is only well preserved when so much salt and other preservatives are dissolved in the waterdrops contained in the margarine (in churning, these drops are minutely and equally divided), so that the growth of the most dangerous moulds (e.g. Cladosporium) is quite impossible.* In this respect therefore the water percentage of the butter plays an important part. As the percentage becomes higher, more preservatives must be added in order to preserve the margarine satisfactorily. Further, part of the salt and the preservative is always withdrawn from the solution in water because it is either enveloped by the fat or perhaps becomes partly dissolved in it (e. g. benzoic acid.) With borax, boric acid and sodium benzoate however, the greater part is traced in the aqueous part of the butter, whereas benzoic acid may combine with the albumen of the milk, which is still present in the butter. On the whole, experiments pointed out that the quantity of preservative required in order to keep margarine fresh is larger than one would infer from experi-

ments on the growth of moulds in liquids, considering the amount of water in the butter.

To test the durability of a sample of vegetable margarine two methods may be followed. In the first it may be kept at 20° C. (after having been inoculated with a mould causing rancidity e. g. Cladosporium butyri), and then examined occasionally. One may also melt the margarine carefully, gather the water and inoculate this after sterilisation with Cladosporium butyri. The latter method is less reliable and in the examination only the former was applied. By the addition of certain quantities of preservatives to the vegetable margarine, this latter being inoculated with Cladosporium, the right quantity of preservatives was found in order to keep the butter fresh for five weeks at the least.

It appeared from this that preservation with salt alone requires 2,5-3 %, according to the percentage of water in the butter. Therefore preservation is possible with salt alone, but it has this great drawback that the flavour of the butter suffers very much; 2 % of salt might be considered as maximum to an average 14 % of water. When this quantity of salt or less is used the addition of preservatives as benzoic acid, sodium benzoate, boric acid or borax is inevitable, if the vegetable margarine is to satisfy the public.

The research brought to light that a percentage of 2 % salt preserves vegetable margarine satisfactorily, when 0.075 % of benzoic acid or 0.2 % sodium benzoate or a mixture of 0.05 % benzoic acid and 0.05 % sodium benzoate is added. Sodium benzoate is easily soluble in water; when added as a solution it is the most efficient.

Vegetable margarine may also be kept fresh with the addition of borax and boric acid, seeing that borax is easily soluble in saltsolutions when boric acid is mixed at the same time. It is clear that the solubility in water of preservatives is of importance, as this indicates the rapidity with which these preservatives get into the water contained in the margarine, during the mixing process. Therefore the easily soluble sodium benzoate is to be preferred to benzoic acid though the latter is a much stronger preservative. Borax is only soluble in saltsolutions to a small extent, but it easily dissolves when to 2 parts of borax

1 part of boric acid is added. 0.4 % of borax and 0.2 % of boric acid mixed in a concentrated solution (together with 2 % of salt) are sufficient to make the vegetable margarine keep fresh for at least 5 weeks.

By means of the above mentioned experiments we are able to recommend the following means in order to avoid rancidity in vegetable margarine:

1. Greatest possible cleanliness in manufacture. Regular disinfection of the utensils, machines, etc.

2. Addition of sufficient and carefully weighed quantities of the preservatives mentioned above.

3. Addition of a quantity of salt in proportion to the amount of water in the vegetable margarine.

4. Continuous attention to the purity and the percentage of the preservatives, to the amount of water in the margarine, to the quantity of margarine required for each mixture and to the length of time the product keeps fresh.

Finally it may be observed that no effective prevention of rancidity of vegetable margarine can be obtained without the use of preservatives and that it is indeed possible to prevent rancidity if attention is paid to the above prescriptions.

OSS, September 1918.

DIE KLEINSCHE HÜHNERSEUCHE

VON

Dr. H. VAN STRAATEN und Dr. B. J. C. TE HENNEPE,

Bakteriologen am Reichsseruminstitut in Rotterdam.

Einleitung.

Der Name Kleinsche Hühnerseuche ist seit 1906 in den Niederlanden im Gebrauch für eine akute, ansteckende Krankheit bei Hühnern, welche soviel Ähnlichkeit zeigte mit der am Ende des vorigen Jahrhunderts von E. KLEIN in London als Fowlenteritis, Enteritis gallinarum, infektiöse Hühnerenteritis beschriebenen Hühnerdiarrhöe, dasz die Krankheit und der Bazillus, welcher dieselbe verursacht, am Reichsseruminstitut, anfangs unwillkürlich, mit dem Namen des genannten Untersuchers verbunden wurden.

Es stellte sich bald heraus, dasz die Namen Kleinsche Hühnerseuche und Kleinsche Bazillus sich dermaszen bei den Hühnerzüchtern eingebürgert hatte, dasz es erwünscht war dieselben beizubehalten.

Dadurch ist auszerdem Verwirrung mit Geflügelcholera und andern Enteritiden besser zu umgehen als durch den Gebrauch obenerwähnter Namen.

Bald nachdem die ersten Fälle am Reichsseruminstitut untersucht worden waren, stellte sich heraus, dasz die Krankheit in den Niederlanden herrschend vorkam und von wenigstens ebenso groszer Wichtigkeit für die Hühnerzucht ist als die Cholera.

Geschichtliches.

Im Jahre 1888 brach auf der Hühnerzuchterei von COOK in Orpington (Kent) eine ansteckende Krankheit aus, wodurch er in einem Jahre 400 Hühner, von welchen 200 während der ersten zwei Monate, verlor. Anfangs wurde an Cholera gedacht, aber schon bei den Sektionen der Kadaver, welche Klein zugeschickt wurden, kam bei ihm das Vermuten auf, dasz es sich hier um eine von Cholera ganz abweichende Krankheit handelte. Bei der von Klein und Wood fortgesetzten Untersuchung konnten sie, auszer der Spezifizität der Krankheit auch viele morphologischen und biologischen Eigenschaften der gefundenen Bazillen nachweisen.

Auch gelang es mittels abgeschwächter Kulturen mit günstigem Erfolg zu impfen. Genannte Untersuchungen sind in einem Büchlein, erschienen im Jahre 1892, ausführlich beschrieben. [1])

Die Beobachtungen von KLEIN sind kurz die folgenden:

Sektionsbefund. Das Herz voll geronnenen Blut; Lungen normal. Darmschleimhaut und Serosa rot; in den Blinddärmen viel flockiger, homogener Schleim von gelber, grauer oder bräunlicher Farbe; in dem Kloak grüngelbe, dünne Faezes. Milz 2 à 3 Mal vergröszert, bei durchschneiden nicht blutig. Leber etwas vergröszert, weich und schlaff, die Oberfläche, so wie das ganze Bauchfell, feucht, bisweilen mit ein wenig Exsudat bedeckt. Nirgends im Körper finden sich Haemorrhagiën vor.

Die Bakterien. In Blutpräparaten wenig Bakterien, in der Milz etwas mehr.

Dimensionen: 0.3—0.4 zu 0.8—1.6, Enden rund. Unbeweglich. Keine Sporen. Die Bakterien können das Austrocknen schlecht ertragen. Einspritzung bei Tauben und Kaninchen erfolglos. Bei Hühnern veranlaszt eine Injektion mit Bakterien oder Fütterung mit Darmschleim nach 4 à 5 Tagen Diarrhöe und 2 à 4 Tage später den Tot. Fütterung mit Kulturen in den meisten Fällen ohne Erfolg. Auf Gelatine nach 24 Stunden mit der Lupe Koloniën sichtbar als graue, durchscheinende Pünktchen, welche am zweiten und dritten Tage schnell auswachsen zu durchscheinenden Kolonien mit dünnen unregelmäszigen Rändern; maximum Wachstum nach 3 Wochen bis 3 m.M. Durchmesser. In der tiefen

[1]) The etiology und pathology of Grouse Disease and Fowl Enteritis.

Gelatine Wachstum sehr beschränkt. Keine Verflüssigung. In Bouillon bei 37° schnelles Wachstum mit Sediment nach einigen Tagen. Bei Impfung auf Agar entsteht nach einem Tage bei 37° ein grauer Strich mit unregelmäszigen Rändern, welcher nach einer Woche über die Oberfläche ausgewachsen ist. Die natürliche Infektion findet nicht statt durch die Luft, sondern durch die Exkremente. Dafür spricht folgender Versuch:

Mit Eisengaze wurden 2 neben einander liegende Stücke Land umgittert, so, dasz zwischen den beiden Stücken ein Pfad von 1½ Fusz frei blieb. In jeder der beiden Abteilungen wurden 10 gesunde Hühner gebracht, von denen diejenigen, welche zur Abteilung A bestimmt waren, mit Kultur geimpft wurden. Alle diese 10 Hühner erkrankten nach 5 Tagen, 7 verendeten und 3 genasen. Ein Huhn aus Abteilung B entwischte nach A, wurde krank und starb. Ein fremdes Huhn, das auch in A gelangte, erlitt dasselbe Los. Die 9 Hühner in B blieben völlig gesund. Später geimpft, starben sie bis auf eins.

Vaccine. Bouillonkultur bei 37° gezüchtet und Kulturen nach Passage durch Kaninchen, erwiesen sich als nicht hinreichend für den Zweck. Ein brauchbares Vaccin bekam KLEIN durch Erhitzung der Bakterien während 20 Minuten bei 55°.

Im Jahre 1895 kommt KLEIN noch einmal auf die Krankheit zurück in einer Veröffentlichung über die Differentialdiagnose der Mikroben der Swinefever und der infektiösen Hühnerenteritis. Daraus erfahren wir, dasz er in den letzten 3 Jahren fünf Epizoötien von Fowlenteritis beobachtet hatte und zwar 3 in Irland und 2 in England. Besonders in Irland kam die Krankheit in groszem Umfange vor und erforderte viele Schlachtopfer, was den armen Bewohnern vom Lande, für welche die Hühnerzucht in manchen Gegenden die Haupterwerbsquelle war, groszen Schaden zufügte. Nicht ohne Bedeutung ist auch die Mitteilung von KLEIN, dasz ihm vor der Zeit keine Epizoötie von Geflügelcholera in Grosz-Britannien bekannt war.

Auszer den Mitteilungen von KLEIN selbst stehen uns in der Literatur keine andern Angaben über die Krankheit zu Gebote. In den neuesten Handbüchern der veterinären Pathologie wird sie nur vollständigkeitshalber, unter Bezugnahme auf die ursprüngliche Publikation, erwähnt. Aus im Jahre 1916 in London eingezogenen Erkundigungen haben wir erfahren, dasz in

England den Untersuchungen von KLEIN kein Wert beigelegt werden, dasz dem Mikroorganismus nur postmortale Bedeutung zugeschrieben wird und das Coccidiose als die Hauptursache der Hühnerdiarrhöe betrachtet wird.

In wiefern diese Auffassung in England richtig ist, lassen wir dahingestellt. Wir halten es für sicher, dasz dasjenige, was wir hier unter Kleinsche Hühnerseuche verstehen, mit Coccidiose in keiner Verbindung steht, und dasz die Bakterien, welche wir bei den Krankheitsfällen gefunden haben, keine postmortale, sondern eine rein aetiologische Bedeutung haben.

Die Krankheit in unsrem Lande. Ueber das erste Auftreten und die Ausdehnung der Krankheit in unsrem Lande kann nichts mit Bestimmtheit mitgeteilt werden. Man musz annehmen, dasz sie hier, bevor sie im Jahre 1906 zum ersten Male konstatiert wurde, schon herrschte. Die Zunahme der Anzahl der im Laboratorium konstatierten Fälle und die gröszere Anzahl der Gemeinden, aus welchen die eingeschickten Hühner herrührten, dürfen natürlich, mit Rücksicht auf die bessere Organisation und die bessere Kontrolle in der Geflügelzucht und demzufolge auf die gewissenhaftere Erkennung, nicht als maszgebend für die Ausdehnung der Krankheit in Betracht kommen, aber aus Mitteilungen von Hühnerzüchtern oder ihrer Vereine und aus eigenen Beobachtungen darf man schlieszen, dasz im Laufe der Jahre die Krankheit sich, sowohl betreffs der Anzahl Fälle als der Anzahl Gemeinden, ausgedehnt hat.

So ist es gewisz, dasz sie sich von der Umgegend von Deventer allmählich nach Norden verbreitet hat, mit der Folge, dasz in den Sommern der Jahre 1911 und 1912 in der Nähe von Wijhe und Windesheim Tausende von Hühnern verendeten. In diesen Gegenden konnte auch festgestellt werden, welche bedeutende Rolle die Wasserläufe und Gräben spielen bei der Verbreitung des Virus. Die Infektion des Wassers, welche durch die kranken Hühner auf den Ufern anwesend, stattfand, wurde noch gefördert durch die Unachtsamkeit der Bewohner, welche die gestorbenen Hühner nicht selten ins Wasser warfen, wie die zahllosen schwimmenden Hühnerkadaver bewiesen. Nun konnte wiederholt nachgewiesen werden, das Hühner welche direkt mit dem Wasser in Berührung kamen, oder sich befanden auf Stücken Land, welche bei hohem Wasserstande

überschwemmt gewesen waren, von der Krankheit angegriffen wurden, während Hühner, welche nicht frei umhergingen auf

demselben Terrain, von der Krankheit verschont blieben.

Es ist auffallend, dasz die meisten Fälle, welche im Laboratorium nachgewiesen wurden, immer aus bestimmten Gegenden

herrührten. Bekannt sind in dieser Hinsicht die Umgegend von Amersfoort, Barneveld, Apeldoorn, Deventer, die Meyery, der Peel und der südliche Teil von Südholland.

Aus den drei nördlichen Provinzen wurden bakteriologisch keine Fälle nachgewiesen, während aus den Provinzen Nordholland und Seeland nur einige Fälle verzeichnet worden sind.

Vorstehende Karte gibt über das Vorkommen der Krankheit in unsrem Lande Auskunft. Sie gibt nur die Gemeinden an, wo die Krankheit im Laufe der zehn letzten Jahre konstatiert wurde, ohne nähere Umstände.

Dasz die ökonomische Bedeutung nicht gering ist, geht aus der Tatsache hervor, dasz eine zur Sache kompetente Person den Schaden, welcher die Krankheit im Jahre 1913 in der Umgegend von Barneveld verursacht hat, auf *f* 100.000 schätzt.

Wenn man in Betracht zieht, dasz die Hühnerzucht auf dem Lande gewöhnlich noch in primitiver Weise ausgeübt wird, ohne dasz man die einfachsten, hygienischen Maszregeln zur Anwendung bringt, so kann man berechnen, dasz der Schaden für das ganze Land kolossal ist.

Das Vorkommen, der Verlauf und die Erscheinungen.

Die meisten Krankheitsfälle kommen vor im Frühjahr und in der ersten Sommerzeit; in keiner einzigen Jahreszeit verschwinden sie ganz und gar. Es ist wahrscheinlich, das Zeiträume, in welchen die Tiere schlecht wachsen, Futter, Witterung u. s. w. die Empfindlichkeit für die Krankheit erhöht.

In welchem Alter die Hühner am empfindlichsten sind, läszt sich nicht nachweisen, aber es ist gewisz, dasz die Kücken am wenigsten zu leiden haben. Bei Kücken, welche einige Wochen alt waren, wurde die Krankheit fast nie konstatiert. In der Regel wurden nur Legehennen zur Untersuchung angeschickt. Ob die Empfindlichkeit für die beiden Geschlechter verschieden ist, konnte nie beobachtet werden.

Der Verlauf der Krankheit ist gewöhnlich akut, von einem halben Tage bis zu 5 Tagen. Chronische Fälle sind selten, aber von pathologisch-anatomischem Standpunkt von Interesse.

Den meisten Federviehzüchtern nach beläuft sich der Verlauf auf ungefähr 2 Tage. Die erste und wichtigste Erscheinung ist

Diarrhöe, wobei dünne, grüngelbe Faeces entleert werden. Die Tiere verweigern jede Futteraufnahme, aber sind sehr durstig. Meistens tritt der Tod nach dem Ende der 2 Tage unerwartet ein, aber auch wurden während der Diarrhöe in vielen Fällen Schläfrigkeit, Trägheit und Traurigkeit beobachtet. Das Blau werden des Kamms und der Lappen darf auch als eine, obgleich nicht konstante, Erscheinung der Krankheit erwähnt werden.

Der Umfang der Sterblichkeit ist von den Eigentümern sehr verschieden angegeben worden. Aus diesen nicht immer deutlichen Angaben läszt sich schlieszen, das bei einigermaszen ausgedehnten Hühnerzuchtereien, durchschnittlich, 3 à 4 Hühner pro Tag an der Krankheit sterben.

Dasz angegriffene Tiere von der Krankheit genesen, kommt zwar vor, aber diese Fälle sind nur gering.

Pathologische Anatomie.

Die äuszeren Symptome, welche bei den Kadavern vorhanden sein können, sind: dunkelrote bis schwarzblaue Verfärbung von Kamm und Lappen und das Zusammenkleben der Federn um den Kloak durch grün- oder gelbgefärbte Faezes.

Von den innern Veränderungen sind die des Darmkanals und der Leber konstant vorhanden. Letztere sind auszerdem so charakteristisch für die Krankheit, dasz sie, bei einiger Routine, eine makroskopische Diagnose ermöglichen.

Darm. Der Kropf, der Drüsenmagen und der Muskelmagen können auszer acht bleiben. Die Schleimhaut des Darmes befindet sich in einem Zustande katarrhaler Entzündung. Der Grad, der Ort und die Ausdehnung des Katarrhs sind aber sehr verschieden. Bisweilen ist er an einigen Stellen lokalisiert und in andern Fällen reicht er vom Magen bis zum After.

Gewöhnlich aber ist das erste Viertel oder das erste Drittel der Schleimhaut am deutlichsten angegriffen. Eine intensive Entzündung der beiden Blinddärme gehört auszerdem nicht zu den Seltenheiten. Der Charakter des Katarrhs ist bald schleimig mit sehr vielem Exsudat, bald mehr purulent mit wenig Exsudat.

In heftigen Fällen ist der Darm, wegen des reichlich gebildeten Schleimes, deutlich ausgedehnt, sodasz beim Öffnen der

Inhalt in der Form groszer, mehr oder wenig durchscheinender Flocken zum Vorschein tritt. Oft ist der Schleim grün und stimmt überein mit der Farbe der in der Gallenblase gewöhnlich reichlich vorhandenen Galle.

Herrscht der purulente Charakter vor, so ist die Schleimhaut mit einer dünnen Schicht von weichem, wenig zusammenhangendem Exsudat bedeckt, welche mikroskopisch fast ganz aus Leukozyten besteht. In diesen Fällen ist die Farbe gelb, nur sehr selten grünlich.

Je intensiver der Katarrh, je weniger gewöhnliche Faeces sich in dem Lumen vorfinden. In den heftigen Fällen ist der ganze Darm leer, ausgenommen die Blinddärme, in welchen noch immer Faezes vorhanden sind.

Der Kropf und der Muskelmagen können in all diesen Fällen noch mit normalem Inhalt gefüllt sein.

Die Hyperaemie, welche gewöhnlich nicht sehr auffallend ist, kennzeichnet sich durch eine stärkere Füllung der Gefäsze des Mesenteriums und der Darmwand und durch Rötung der angegriffenen Schleimhautteile.

Haemorrhagien können vorkommen in der Form von punktgroszen Blutungen in der Schleimhaut. Selten ist das Austreten von Blut auszerhalb der Schleimhaut makroskopisch zu beobachten. Bei einigen Kücken liesz sich aber eine heftige haemorrhagische Entzündung der Blinddärme nachweisen. Die Darmschleimhaut zeigt vom Magen bis zum After gewöhnlich eine saure Reaktion, aber mit groszen graduellen Unterschieden.

Leber. Dieses Organ ist einigermaszen geschwollen und beim Durchschneiden ziemlich blutreich, fettig degeneriert, schlaff und leicht zerbrechlich.

Die Farbe der Einschnitte variiert zwischen gelb und braun.

Charakteristisch ist die bronzeartige Verfärbung der Leberoberfläche. Die Bronzefarbe wird deutlicher je nachdem das Kadaver länger offen liegt.

Bei kürzlich gestorbenen Hühnern ist sie bisweilen nicht oder undeutlich vorhanden. Läszt man aber ein derartiges Kadaver einige Stunden offen liegen, so tritt die Verfärbung allmählich deutlicher ein.

Diese Leberfarbe ist von uns zahlreiche Male kontrolliert durch Vergleich mit Farbe und Verfärbung von Lebern aus

andern Kadavern. Nur bei einigen jungen Kücken von 1 1/2 Woche alt, bei welchen Tieren ausnahmsweise die Kleinsche Hühnerseuche konstatiert wurde, konnte die Erscheinung nicht beobachtet werden. Anstatt derselben fand sich eine starke ikterische Verfärbung vor.

Lungen. Die Lungen können sehr blutreich sein, und auch hier ist öfters eine Nachfärbung, aber eine dunkelgraue, beobachtet.

Herz und Nieren. Bis auf parenchymatöse Degeneration und viel Blut in den Nieren, wiesen diese Organe keine Veränderungen auf.

Muskelgewebe. Anfangs bei einigen Kücken von 1 à 2 Monaten alt, später auch bei erwachsenen Hühnern, unter welchen sich ein künstlich infiziertes Exemplar befand, wurden Veränderungen im Muskelgewebe beobachtet, welche, in Bezug auf die grosze Anzahl Fälle der Kleinschen Hühnerseuche, selten genannt werden dürfen, aber dessenungeachtet eine nähere Betrachtung wert sind. Es ist wahrscheinlich, dasz diese Veränderungen den mehr chronisch verläufenden Fällen eigen sind.

Bei obenerwähnten Kückenkadavern, welche aus einer Brut herrührten, fiel es bei der Zerlegung sofort auf, dasz alle Körpermuskeln ein weiszfleckiges Äuszeres hatten und dasz im Muskelmagen und im Herzen, auszer weiszen Flecken, auch hinausragende Knoten, wie bei Tuberkulose, vorhanden waren.

Bei der mikroskopischen Untersuchung stellte sich heraus, dasz die Flecke und Knoten verursacht wurden durch Leukozyten-Infiltrationen zwischen den Muskelfasern. Neigung zu Erweichung wurde nicht beobachtet.

Ausstrichpräparate aus den weiszen Teilen und aus den normal aussehenden Flecken wiesen auf, dasz in dem Infiltrat eine grosze Anzahl kurze Bakterien vorhanden war, welche Bakterien in dem normalen Teil nicht oder nur sporadisch nachgewiesen werden konnten.

Es stellte sich heraus, dasz in den Kulturen derselbe Unterschied bestand, und auszerdem, dasz die erwähnten Mikroben Kleinsche Bakterien in Reinkultur waren.

Ein andres Beispiel künstlicher Infektion ist folgendes:

Einem gesunden jungen Huhn (erwachsen) wurde 1/2 c.M³. einer Leberemulsion, welche von einem an der Krankheit gestorbenen

Huhn herrührte, in einen der Lappen eingespritzt. Die Reaktion am Lappen war sehr gering und auch der Gesundheitszustand des Tieres änderte sich in den ersten 10 Tagen fast nicht. Darauf wurde das Tier krank, bekam Durchfall und magerte schnell ab. Siebzehn Tage nach der Infektion tratt der Tod ein.

Zerlegungsbefund: Kadaver eines stark abgemagerten Tieres. Im Lappen eine dünne Schicht zähen, dunkelgelben Exsudats. In dem Herzmuskel und in dem Magenmuskel zahlreiche weisze, mehr oder weniger hinausragende Herde. Die hintere Darmhälfte mit geschwollenen Follikeln besetzt. Die mikroskopische und die kulturelle Untersuchung gaben denselben Erfolg wie oben. Die Sektionen der andern Fälle stimmen mit diesem Fall überein, nur der „fleckige" Charakter tratt in den Vordergrund.

[In Bezug auf das Obenerwähnte entnehmen wir einer Veröffentlichung von LUCET [1]) über die „dysenterie epizoötique des poules et des dindes" folgendes:

Er unterscheidet akute und chronische Fälle:

Akut: Blut nicht geronnen, blasz. Seröse Flüssigkeit im Pericardium. Herz schlaff, bisweilen mit Petechien. Lungen gewöhnlich normal, bisweilen leicht hyperaemisch. Leber leicht zerbrechlich, blutreich beim Einschneiden, Gallenblase stark ausgedehnt. Milz vergröszert und dunkel. Nieren hyperaemisch. Darm blutreich, gefüllt mit Schleim oder seröser Flüssigkeit, gelb oder grünlich, mit Extravasaten auf der Mucosa.

Chronisch: Darmentzündung. Milz normale Grösze, Leber eigentümlich grün gefärbt, bisweilen atrofiert. Blut blasz. Herz klein und schlaff, parenchymatöse myositis, charakterisiert durch die Anwesenheit gelber Punkte, in dem Herzmuskel oder an der Innenwand bisweilen von der Grösze kleiner Erbsen, welche sich stark gegen das übrige Muskelgewebe abheben.

Mikroskopisch erweisen die Herde sich als Lymphzellen-Infiltrationen.] LUCET betrachtet die gefundenen Bazillen als nicht identisch mit den Bazillen von KLEIN. Ein Vergleich der Kleinschen Krankheit mit der Krankheit nach LUCET und mit andern verwandten Krankheiten wird in einem folgenden Kapitel behandelt werden.

Einige Beispiele der Zerlegungsbefunde:

[1]) Annales de l'Inst. Pasteur 1891, Seite 312.

1. Erwachsene Legehenne. Darm ganz mit Schleim gefüllt, sehr stark hinter dem Muskelmagen, Schleimhaut der Blinddärme geschwollen und dunkelrot gefärbt. Auszer in den Blinddärmen keine Nahrungsbestandteile vorhanden. Farbe des Inhalts grün, in den Blinddärmen gelb. Leber wenig geschwollen, bröcklig und gelbbraun beim Durchschneiden. Bronzefarbe der Leberoberfläche. Milz vergröszert, dunkelrot. Lungen dunkelgrau. Herz blasz, gefüllt mit Gerinsel. Nieren geschwollen und degeneriert.

2. Kücken, 13 Wochen alt. Geringer Darmkatarrh. Faezes überall vorhanden, besonders in den Blinddärmen und daselbst von einer Schleimschicht umgeben. Leber wenig geschwollen, beim Zerschneiden normale Farbe, Oberfläche fein marmoriert und bronzeartig glänzend. Milz geschwollen und dunkelrot. Herz, Nieren und Lungen unverändert.

3. Erwachsenes Huhn. Kamm, Lappen, und alle Kopfschleimhäute stark cyanotisch. Der äuszere Darm sehr blutreich. Das erste Drittel der Schleimhaut stark entzündet, das Mittelstück wenig, die Blinddärme gar nicht und das letzte Stück wieder entzündet. In dem ersten Teil sehr viel gelbgrüner Schleim.

Faezes fast ganz verschwunden. Leber beim Zerschneiden hellbraun, nicht bröckelnd, mehr zäh. Oberfläche bronzefarbig. Milz ein wenig geschwollen, aber normal gefärbt. Übrigens keine Veränderungen.

4. Erwachsenes, sehr fettes Huhn. Darmkanal völlig leer. In der ersten Hälfte ist die Schleimhaut mit ein wenig Exsudat (Zellen) bedeckt, welches nach hinten abnimmt. Zweite Hälfte des Darmes: normal-Exsudat von hellgelber Farbe, welche nach hinten braun wird. Stellenweise Schleimflöckchen gelber oder grauer Farbe. Punktblutungen auf der entzündeten Schleimhaut. Alle Bauchorgane sehr blutreich. Die äuszere Leber hat das typische Aussehen. Beim Zerschneiden Kakaofärbig; einige Teile fettig degeneriert.

Bakteriologie (Bacillus gallinarum). [1]

Die Kleinschen Bazillen sind Stäbchen mittlerer Grösze mit abgerundeten Enden. Sie können nicht nach Gram gefärbt werden, bilden keine Sporen und sind unbeweglich.

Man kann dieselben in dem Blut und in den Organen der an

[1] Dieses Kapitel wird später als Sonderarbeit und ausführlicher behandelt werden.

der Krankheit verendeten Hühner in Reinkultur nachweisen. In dem Darminhalt kommen sie vor neben andern Bakterien, aber selten in überwiegender Anzahl (wenigstens nach den Kulturen auf den gewöhnlichen Nährboden). Die Blutkulturen aus dem Herzen und den groszen Gefäszstämmen wachsen gewöhnlich weniger, als die Kulturen aus der Leber, der Milz und den Nieren.

Die Bazillen kommen nicht nur als isolierte Stäbchen vor, sondern auch in dem Gewebe als Doppelstäbchen, aber fast nicht in gröszerem Zusammenhang.

Mit den gewöhnlichen Farbstoffen lassen sie sich gut färben, aber, im Vergleich zu andern Bakterien, nicht sehr schnell und intensiv, oft nur blasz oben an den Polen. Die bipolair gefärbten Bazillen sieht man besonders in Präparaten mit wässeriger Methylenblaulösung gefärbt. Auch findet man in diesen Präparaten oft Exemplare, bei welchen nur die Umrisse deutlich gefärbt sind.

Auffallend ist der geringe Anzahl Bazillen, welche in Ausstrichpräparaten der Organe, aber besonders in denen des Blutes, sichtbar ist. Das Vorkommen von nur 2 oder 3 Bazillen in einem Gesichtsfeld, mit $\frac{1}{1\frac{1}{2}}$ Ölimmersion und Okulär IV, ist keine Seltenheit. Die gezüchteten Bazillen sind, in Bezug auf Form und Färbbarkeit, nicht verschieden von denen aus dem Organismus. Im hängenden Tropfen, genommen aus dem Kondenzwasser von Agarkulturen, sieht man die Bazillen grösztenteils gruppenweise geordnet, immer mit ihren Längenachsen parallel und dicht zusammengeschlossen. Schwimmt solch eine Anzahl zusammenhängender Bakterien vertikal im Tropfen, so bekommt man den Eindruck eines Häufchens Kokken. Diese Gruppierung der Bazillen, welche zwar nicht spezifisch ist, aber welche mit andern Eigenschaften zur Unterscheidung beitragen kann, findet sich nicht in Bouillonkulturen.

Kultur. Das Züchten der Bazillen bringt keine Schwierigkeiten. Auf gewöhnlichem Agar und in Bouillon bekommt man bei Bruttemperatur, innerhalb 18 Stunden, üppiges Wachstum.

Eine bestimmte Reaktion der Nährboden (natürlich innerhalb gewiszen Grenzen) ist kein Erfordernis. In der an sich ziemlich sauren Hühnerfleischbouillon z.B. ist das Wachstum nicht minder üppig als in der alkalisierten Bouillon.

Das Wachstum der Bazillen veranlaszt in den gewöhnlichen alkalischen Nährmedien keine Reaktionsveränderung; auch nicht in sauren Medien. Nur in Milch läszt sich nach einigen Wochen eine geringe Neigung zur Säuerung nachweisen. Gerinnung tritt aber gar nicht ein.

Gewönliche Zucker werden nicht angegriffen, die Farbe der Kolonien auf Endoagar ist weisz, während die Farbe von Lackmusmolke unverändert bleibt, oder ein wenig in Blau umschlägt. Indolbildung in peptonhaltigen Kulturen wurde nicht beobachtet, auch keine Verflüssigung von Gelatinekulturen.

Auf Agar ausgestrichenes Material aus den Organen eines gestorbenen Huhnes, bildet nach 18 Stunden bei 37° Kolonien, welche höchstens 1 m.M. Durchmesser haben. Der Umrisz ist mit bloszem Auge gesehen rund, mikroskopisch aber mit schwachen Abplattungen und kleinen Biegungen versehen. Die Grenze ist aber scharf, das heiszt ohne dünne oder neblige Ausläufer.

Die Farbe der Kolonien ist grau. Sie sind undurchsichtig mit glänzender Oberfläche. Das Wachstum bei 22° ist anfangs sehr langsam. Nach 24 Stunden ist von einer Streichkultur auf Gelatine kaum etwas sichtbar.

Während der folgenden Tagen scheinen die Bazillen schneller zu wachsen. Schlieszlich hat die Kultur, hinsichtlich des Aussehens und der Ausdehnung, Ähnlichkeit mit einer Kultur der Vertreter der Coligruppe.

Verwandtschaft. Aus Agglutinationsversuchen ging hervor, dasz der Bazillus gallinarum mit den Vertretern aus der Typhus-Coligruppe verwandt ist. Die Reaktion läuft z.B. mit Gärtner-Serum innerhalb einer Stunde, in Verdünnungen bis $^1/_{500}$, ganz und gar ab. Auch mit Typhusserum trat bisweilen Agglutination ein.

Variabilität. Nicht immer stimmt die Form der Kolonien und Bazillen mit dem gewöhnlichen Typus überein. Es sind nämlich aus Mäusen wiederholt abweichende Kolonien gezüchtet, mit einem durchscheinenden Zentrum und einem unregelmäszigen knotigen Rande; daneben Übergangsformen nach dem normalen Typus.

Die Bazillen der abweichenden Kolonien sind der Mehrzahl nach klein und dünn, während ein kleiner Teil das gewöhnliche Aussehen hat. Es ist nicht gelungen diese Varietät konstant beizubehalten. Übrigens sind in dieser Hinsicht keine besondere

Untersuchungen angestellt worden. Schlieszlich sei noch erwähnt, dasz die Pathogenität für Mäuse und die Agglutination bei den abweichenden Bazillen unverändert war.

Stammunterschied. Hinsichtlich eines agglutinierenden Serums, das mit einem Stamm angefertigt war, konnten weder qualitative noch quantitative Unterschiede zwischen einer groszen Anzahl Stämmen verschiedener Herkunft beobachtet werden. Ebenso wenig in Bezug auf die Pathogenität für Mäuse.

Pathogenität. Spontane Infektion mit Bacillus gallinarum ist uns nur bei Hühnern bekannt. Für die künstliche Infektion ist aber, sofern dies beobachtet werden konnte, nicht das Huhn, sondern die weisze Maus am meisten geeignet.

Weisze Mäuse, subkutan oder in der Bauchhöle infiziert mit $^1/_{10}$ c.M.^{3} einer neu isolierten, frischen Bouillonkultur, verendeten gewöhnlich binnen einigen Tagen. Bei Passage durch Mäuse erhöht sich die Virulenz der Bazillen für diese Tiere; so kann die intraperitoneale, letale Dosis, nach Passage durch Mäuse, bis $^1/_{10.000}$ c.M.^{3} Kultur steigen. Bei Hühnern hingegen ist der Erfolg subkutaner, intraperitonealer und intravenöser Infektion, sogar mit gröszern Quantitäten Kulturmaterial, sehr inkonstant, und der Versuch, die Virulenz für Hühner mittels Hühnerpassage zu erhöhen, ergiebt sehr ungewisze Erfolge.

Es war keine Seltenheit, dasz die Infektion bei der dritten oder vierten Passage miszlang, vielleicht wegen eines ganz unempfindlichen Huhnes oder wegen Abschwächung des Virus, wie dies auch bei Schweinepest wiederholt konstatiert worden ist. Wenn man berücksichtigt, dasz die Krankheit auf sehr ausgedehntem Gebiet vorkommt und die Herkunft der Versuchshühner gewöhnlich völlig unbekannt ist, ist es nicht unmöglich, dasz in dieser Angelegenheit die event. entstandene Immunität eine Rolle spielt. Es hat sich dann auch herausgestellt, dasz im Laboratorium das Immunserum sich am besten an Mäusen kontrollieren läszt.

Auch mit Fütterungsversuchen bei Hühnern wurden sehr verschiedene Resultate erzielt. Einmal aber gelang es durch Fütterung mit Reinkultur während 3 Tage, bei einer Brut von 10 Kücken von 5 Wochen alt, die typisch verlaufende Krankheit zu erregen. Innerhalb 5 Tagen hatten alle Tiere Durchfall und das letzte ging am 7. Tage ein.

Mit Fütterungsversuchen bei Mäusen erzielten wir folgende Resultate:

3 weisze Mäuse wurden vom 8—14. Mai mit einem frisch isolierten Stamm (Brot getränkt in Bouillon) gefüttert. Bis 15 Mai keine Krankheitserscheinungen. Am 16. Mai sind 2 Mäuse gestorben und eine liegt am Tode. Diese geht am 17. Mai ein.

Zerlegungsbefund: Enteritis, besonders des Duodenums. Leber und Milz sehr geschwollen.

Bakteriologischer Befund: Bacillus gallinarum, am wenigsten gewachsen aus dem Herzblut. Das Aussehen der Bazillen stimmte mit dem der Hühnerbazillen überein.

3 weisze Mäuse wurden in derselben Weise vom 18—24 Mai mit einem andern Stamm gefüttert.

Am 26. Mai ist eine Maus tot. Zerlegungsbefund u. s. w. wie oben. Die zwei andern haben Durchfall, von welchem sie aber nach einigen Tagen genesen.

3 weise Mäuse gefüttert vom 29. Juni bis 5. Juli mit einem andern Stamm, blieben bis auf eine am Leben. Zerlegungsbefund u. s. w. der gestorbenen Mäuse wie oben.

3 halbwüchsige weisze Mäuse ebenso vom 29. Juni—bis 5. Juli gefüttert, gingen am 6—7. und 8. Juli ein. Weiteres wie oben.

1 graue Maus verendete nachdem sie 5 Tage gefüttert worden war. Weiteres wie oben.

Eigentümlich war der komatöse Zustand, in welchem sich die meisten gestorbenen Mäuse ungefähr 1/2 Tag vor dem Tod befanden. Auszer der Körperwärme und der Atmung gaben die Tiere keine Lebenszeichen mehr. Die Atmung war tief und träge, bisweilen mit Zwischenräumen von 10 à 15 Sekunden.

Zwei wilde, graue Ratten wurden während einer Woche mit groszen Quantitäten Kultur und Organen gestorbener Hühner gefüttert. Nach vorübergehendem Durchfall sind die Tiere gesund geblieben. Subkutane Impfung bei zwei wilden Ratten mit 2 c.M.^{3} frischer Kultur, welche drei Mal durch Hühner passiert war, hatte keine Reaktion zur Folge. Subkutane Impfung mit 2 c.M.^{3} derselben Kultur bei einer zahmen weiszen Ratte blieb ebenso erfolglos. Eine weisze, zahme Ratte und eine wilde Ratte, welche dagegen mit 1 c.M.^{3} intraperitoneal geimpft wurden, gingen nach 5 Tagen ein. (Milz geschwollen, Enteritis, Bacillus gallinarum).

Tauben, Meerschweinchen und Kaninchen sind nicht immer unempfindlich, aber als Versuchstiere ebenso wenig geeignet wie die Ratten. Ein Meerschweinchen, welches intraperitoneal mit einer groszen Dosis Kultur eingespritzt wurde, starb. Auch ein Kaninchen, das mit 1 c.M.^{3} frischer Kultur in derselben Weise geimpft wurde, verendete nach 3 Tagen (Enteritis mit vielem Schleim, Bacillus gallinarum).

Eine Taube wurde intramuskulär mit 1 c.M.^{3} Agarkultur geimpft und starb nach 8 Tagen. (Die Stelle in der Brustmuskel, an welcher die Impfung erfolgt war, ist in Nekrose übergegangen, Leber parenchymatös degeneriert, nich geschwollen. Darm katarrhal entzündet. Der Darminhalt besteht aus vielem gelb-grün gefärbtem Schleim. Kulturen: Bac. gallinarum.)

Bekämpfung ansteckender Geflügelkrankheiten im allgemeinen. Impfung gegen die Kleinsche Hühnerseuche.

Solange man es noch nicht als notwendig betrachtet, die ansteckenden Geflügelkrankheiten gesetzlich zu bekämpfen, wird aus einer gründlichen Bekämpfung nicht viel werden. Die Beteiligten müssen deshalb vorläufig die Bekämpfung auf sich nehmen, wozu gemeinschaftliches Auftreten ein Haupterfordernis ist.

Es bestehen in unsrem Lande Geflügelzüchtervereine u. a., die V. P. N., mit ihren zahlreichen Unterabteilungen, welche in dieser Hinsicht nützliche Arbeit leisten können und auch schon geleistet haben.

Seitens der Regierung wird ihnen aber kräftige Hilfe gewährt; man denke nur an die Mitwirkung und die finanzielle Hülfe, welche der V. P. N. und den von diesem Verein angestellten Konsulenten von der Regierung geleistet wird, an die Gelegenheit für unentgeltliche Untersuchung nach Krankheitsursachen am Reichsseruminstitut und an die Aufklärungen und Ratschläge, welche diese Anstalt erteilt.

Es bleiben aber der Bekämpfung noch viele Hindernisse im Wege stehen, welche teils auf Unwissenheit, teils auf Mangel an gesetzlichen Maszregeln beruhen.

Ungünstige Umstände. Betrachten wir nur die Verbreitung der Ansteckungsstoffe. Der Transport von Kranken und gestor-

benen Hühnern kann leider ungestraft stattfinden. An vielen Orten werden, wenn eine Krankheit wütet, die gestorbenen Hühner von Händlern aufgekauft, welche dieselben als geschlachtete Exemplare anbieten und den Hühnerhändlern in den Städten verkaufen. So ist es uns bekannt, dasz während einer Cholera-epizoötie in Landsmeer, anfang 1915, ein Eigentümer seine Kadaver gegen *f* 0.75 das Stück absetzte.

Die Korbe und Wagen, in welchen die Kadaver befördert wurden, werden am nächsten Tage, in demselben Zustand, wieder für den Transport gesunder Vögel gebraucht.

Weil die gestorbenen Vögel keinen Wert mehr haben, werden sie oft in nachlässigster Weise auf Düngerhaufen, in Flüszchen, Kanäle oder Gräben geworfen. In der Gemeinde Landsmeer hat man die Gefahr derartiger Handlungen eingesehen und das Werfen gestorbener Vögel in die Gräben polizeilich verboten.

Ein andres allgemein gebräuchliches Übel ist das zu Markte bringen der noch lebenden Hühner aus Beständen, in welchen eine ansteckende Krankheit ausgebrochen ist. Auch musz die Aufmerksamkeit gelenkt werden auf das mangelhafte Unterkommen und die schlechte Pflege der Hühner, wie man diese bei den Bauern noch sehr oft findet. Es wird da eigentlich nur auf die Eier und nicht auf die Hühner geachtet. Das Vorhandensein von Krankheiten wird oft nur dann wahrgenommen, wenn viele Exemplare eingehen. Solche Gehöfte und Ställe sind konstante Quellen von Tuberkulose, Diphtherie, Hautkrankheiten und anderen chronischen Infektions- und parasitären Krankheiten, nicht nur für die unmittelbare Umgegend, aber auch für die Märkte, wo solche Tiere oder ihre Eier verhandelt werden.

Eier sind immer mehr oder wenig mit Mist beschmutzt, und weil auszerdem Bakterien durch die Schale in das Ei dringen können, so können mittels Bruteier nicht nur Ansteckungsstoffe direkt in einen andern Stall verschleppt werden, aber sie machen es auch möglich, dasz die Kücken schon im Ei infiziert werden.

Ratschläge für Hühnerzüchter.

Es ist, aus Mangel an polizeilichen Maszregeln, für eine einigermaszen zweckmäszige Bekämpfung notwendig, die Hühnerzüchter fortwährend von dem Nutzen und dem eignen Vorteil einer hygienischen Behandlung ihrer Tiere zu überzeugen. Mit Wort und Schrift müssen von Sachverständigen die notwen-

digsten Begriffe der Hygiene in weiteren Kreise verbreitet werden. Dabei können wichtige Punkte behandelt werden, z.B.: Verbesserung des Unterkommens, sowie genügende Garantien für Reinheit und Qualität von Nahrung und Trinkwasser. Das Observieren der neu angekauften Hühner in gut isolierten Aufenthaltsorten. Die Herstellung einer guten Gelegenheit, die verdächtigen oder weniger munteren Tieren abzusondern. Das Vorschreiben der notwendigen Maszregeln, welche beim Ausbrechen einer ansteckenden Krankheit getroffen werden müssen. Das Angeben von billigen und leicht anzuwendenen Desinfektionsmitteln. Der Nutzen der Verbrennung oder tiefen Begrabung gestorbener Hühner, gleichgültig an welcher Krankheit sie gestorben sind, sofern sie nicht an eine Anstalt zur Untersuchung eingeschickt werden. Im allgemeinen also Maszregeln, um die Gesundheit und die Widerstandsfähigkeit der Hühner zu verbessern, um die Ansteckungsstoffe fernzuhalten und um schon vorhandene Ansteckungsstoffe zu lokalisieren und zu vernichten.

Ein nützlicher Faktor bei der Bekämpfung, vorausgesetzt dasz er mit obenerwähnten hygienischen Maszregeln zur Anwendung gebracht wird, ist die Impfung. Sie findet bei Geflügelkrankheiten bis jetzt nur gegen die Cholera und die Kleinsche Hühnerseuche statt.

Die Impfstoffe gegen die Kleinsche Hühnerseuche.

Als Impfstoffe gegen diese Krankheit werden ein Vaccin und ein Serum benutzt; ersteres für preventive, letzteres für preventive und kurative Zwecke. Das Vaccin wird in dieser Weise angefertigt: Die Bazillen, während 18 Stunden bei 37° auf einer gewöhnlichen schrägen Agarkultur gewachsen, werden in 50 c.M.^{3} physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und darauf eine Stunde bei 60° erhitzt. Die Dosis, welche einem Huhn eingespritzt wird, beträgt 1 c.M^3.

Die Wirkung ist bei Hühnern und Mäusen kontrolliert. Von einer Anzahl Hühner, welche mit dem Vaccin geimpft wurden, ist später kein einziges an einer künstlicher Infektion eingegangen. Auch wurden 9 andere Hühner, welche ebenso mit Vaccin behandelt worden waren, nach Windesheim geschickt wo damals die Krankheit herrschte, und dort mit Hühnern, unter welchen die Krankheit wütete, in Berührung gebracht. Nur eins

dieser Hühner ist nach 4 Wochen an der Krankheit gestorben.

Weiter ist in Amersfoort, im Einvernehmen mit der V. P. N., ein Versuch im Groszen angestellt worden, sowohl mit Serum als mit Vaccin (1912). Später wurden derartige Versuche noch angestellt in Windesheim und Gemonde. In Bezug auf die Resultate siehe unten.

Bei 3 Mäusen stellte sich heraus, dasz die subkutane Impfung von $^1/_4$ c.M.^{3} Vaccin schützend wirkte gegen lebende Bazillen, welche eine Woche später in einer Quantität von $^1/_{20}$ c.M.^{3} in die Bauchhöhle gespritzt wurden. Die Kontrollemaus verendete innerhalb 2 Tagen; eine der vakzinierten Mäuse ging nach 6 Tagen ein. Die anderen zwei Exemplare erkrankten, aber erholten sich bald.

Das Serum, an Pferden hergestellt, wird nicht ohne Schwierigkeiten gewonnen. Die Bereitung musz, mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit der Pferde, mit groszer Vorsicht stattfinden. Anfangs schienen die Pferde so gut wie nichts von der Einspritzung mit nach und nach steigenden Kulturdoses zu leiden zu haben, aber nach einigen Monaten kam die Reaktion. Die Tiere magerten ab, bekamen Digestionsstörungen und Steifheit und wurden lahm. Demzufolge gingen mehrere Pferde verloren.

Schlieszlich lehrte die Erfahrung, dasz es sicherer war, die intravenöse Impfung ganz oder zum gröszten Teil durch subkutane Injektionen zu ersetzen, die Zwischenräume auf wenigstens 10 Tage zu stellen (jedenfalls während der ersten Monate), die lebende Kultur regelmäszig mit abgetöteter Kultur abzuwechseln und nie mehr als 100 c.M.^{3} zu gleicher Zeit einzuspritzen.

Die direkte Reaktion bei den Pferden nach Einspritzung von 1—10 c.M.^{3} Kultur, gleichgültig ob man lebendige oder abgetötete Kultur benutzt, besteht in Verschwindung oder Verringerung der Freszlust, geringe Temperatursteigerung, flüssige Defekation und Apathie während der folgenden ein oder zwei Tage. Diese Reaktion ist weniger heftig oder bisweilen sehr gering nach subkutaner Einspritzung. Auch wenn man anstatt einer Bouillonkultur eine Abschwemmung der Bazillen benutzt, tritt sie weniger heftig auf.

Intravenöse Einspritzung von Bouillonkultur in Mengen von 30—50 c.M.^{3} veranlaszt immer heftige Reaktion, welche ungefähr nach einer halben Stunde anfängt mit Muskelzittern,

besonders der hinteren Körperteile, welches Zittern in stoszende Bewegungen übergehen kann. Weiter Durchfall, Kolikerscheinungen, Schwitzen und Temperatursteigerung. Während der folgenden zwei Tage ist der Freszlust gering und sind die Tiere apathisch.

Dieselbe Wirkung hat eine durch eine Kerze filtrierte Bouillonkultur und auch eine Bouillonkultur, welche 1/2 Stunde bei 60° gestanden hat.

Es stellt sich also heraus, dasz der bac. gallinarum ein ziemlich wirksames Toxin enthält oder wenigstens dasselbe in den Nährboden bilden kann. Auch an Mäusen ist eine toxische, obgleich nicht letale Wirkung von Kulturfiltrat beobachtet worden.

Die schützende Wirkung des Serums läszt sich an Mäusen schon deutlich nachweisen, wenn das Pferd, welches das Serum liefert, mit 200 bis 400 c.M.³ Kultur eingespritzt worden ist, wozu ungefähr 2 Monate nötig sind. So stellte sich nämlich heraus, dasz $^2/_{10}$ c.M.³ Serum eines Pferdes, welches zwei Monate regelmäszig und ohne Störung behandelt wurde, imstande war Mäuse gegen intraperitoneale Infektion mit $^1/_{100}$ c.M.³ virulenter Kultur zu schützen.

In letzterer Zeit sind die Pferde durch Rinder ersetzt worden, welche Tiere ein gleich gutes Serum liefern und resistenter gegen die Bazillen zu sein scheinen.

Die Anwendung der Impfung.

Es versteht sich, dasz das Impfen der Hühner auf finanzielle Schwierigkeiten stöszt, weil die Kosten, welche die Tierärzte für ihre Arbeit berechnen, den meisten Hühnerzüchtern bald zu hoch sind. Diese Schwierigkeiten können aber beseitigt werden, wie aus einer Tarifregelung der Impfungen hervorging, welche im Jahre 1912 von der Abteilung Amersfoort der V.P.N. mit den betreffenden Tierärzten, zu allgemeiner Zufriedenheit der Beteiligten, vereinbart wurde. Im Jahre 1913 wurde den Tierärzten durch das Reichsseruminstitut geliefert 50 Liter Serum und 6 Liter Vaccin, 1914 74 Liter Serum und 10 Liter Vaccin, 1915 77 Liter Serum und 14 1/2 Liter Vaccin und 1916 60 Liter Serum und 10 Liter Vaccin.

Die Impfung des Serums und des Vaccins findet subkutan statt. HUTYRA und MAREK geben als Impfstelle bei Vögeln die Nackenhaut an, weil die Haut dort geräumig liegt und zu einer

Falte gezogen werden kann. Unsrer Meinung nach ist es aber bei Impfungen im Groszen leichter, die Einspritzung an der Brusthaut erfolgen zu lassen. Der Gehilfe hält mit der rechten Hand die Flügel an der Basis fest, mit der linken Hand streckt er die Füsze nach hinten und unten, wodurch die Brust hervortritt. Der Tierarzt hebt mit Daumen und Finger der linken Hand die Brustfedern ein wenig auf, spannt dadurch die Haut und bringt mit der andern Hand die Spritze mit Kanule ein.

Es versteht sich, dasz es nur theoretisch ausführbar ist, bevor die Impfung stattfindet, die Federn der Impfstellen zu entfernen und diese Stellen darauf zu desinfizieren. Es ist also am besten, dasz man nicht zu lange dieselbe Kanule benutzt.

Wenn man genügende Hülfe zur Verfügung hat und eine grosze Spritze gebraucht, hat es sich als möglich erwiesen einige hundert Hühner in einer Stunde zu impfen.

Resultate der Impfungen.

Impfungen in Amersfoort, welche im Oktober 1912 stattfanden.

Total wurden 9654 Hühner geimpft, welche 106 Eigentümern zugehörten. Der Erfolg wurde uns mitgeteilt im Oktober 1913 von 78 Eigentümern betreffs 7622 Hühner. 54 Besitzer teilten aus eignem Antriebe mit, dasz sie sehr zufrieden seien; einige behaupteten sogar „auszerordentlich schöne" und „ausgezeichnete" Resultate erzielt zu haben. Bei den 24 übrigen Besitzern konnten nachstehende Angaben gesammelt werden:

Bei den Hühnern von 16 dieser Eigentümer kam die Krankheit, welche vor der Impfung herrschte, nach der Impfung nicht oder in sehr geringem Masze mehr vor. Bei 7 schien der Erfolg sehr ungünstig zu sein, weil das Sterben erst nach der Impfung anfing. Es ist aber nicht entschieden ob hier die Kleinsche Krankheit im Spiel war, weil keins der verendeten Exemplare untersucht worden ist.

Bei einem Besitzer waren vor der Impfung viele seiner 128 Hühner gestorben; nach der Impfung nur noch eins, welches aber während der Behandlung davongeflogen war.

Ein anderer war unzufrieden, weil das Sterben nach der Impfung zwar sofort aufhörte, aber nach einem halben Jahre wieder anfing. Vor der Impfung verendeten täglich ungefähr 15 Stück, indem nach der Impfung täglich nur ungefähr 5 Stück eingangen. Diese Impfung ist deshalb keineswegs un-

günstig ausgefallen; auf jeden Fall hat man durch die Behandlung zalreiche Verluste vorbeugen können.

Die Zahl der von den praktischen Tierärzten gemachten Impfungen hat in dieser Gegend denn auch zugenommen.

Impfung in Windesheim.

5. Oktober 1912, 228 Hühner von 6 Eigentümern, 6. November 292 Hühner von 7 Eigentümern, 8. und. 9. Januar 1913, 376 Hühner von 15 Eigentümern.

Am 26. Januar kam unter den Hühnern der meisten Besitzer keine Krankheit mehr vor, indem dieselbe während der ersten Impfung noch sehr wütete. Nun wurden alle Hühner mit Vaccin geimpft. Aus einem am 28. Juli 1913 eingegangenen Bericht geht hervor, dasz nur bei 2 Eigentümern noch Fälle der Kleinschen Hühnerseuche nach der Impfung beobachtet wurden.

Die Erfolge waren deshalb in dieser stark infizierten Gegend sehr günstig.

Impfung in Gemonde.

13. November 1912, 484 Hühner von 14 Eigentümern. Aus dem Bericht vom 2. August 1913 ging folgendes hervor:

Die nicht infizierten Bestände, welche mit Vaccin behandelt wurden, blieben gesund. Von den mit Serum behandelten infizierten Beständen starb höchstens 10 %. Die infizierten Bestände, welche nicht geimpft wurden, gingen grösztenteils zu Grunde. Die Erfolge, welche die Tierärzte mit obenerwähnten Impfstoffen in den Jahren 1913 und 1917 erzielten, sind auch im allgemeinen günstig.

Man musz bei der Beurteilung der Resultate der Impfungen sehr vorsichtig sein. Bei den Versuchen im Groszen hat es sich nämlich deutlich herausgestellt, dasz Sterbefälle, welche nach der Impfung vorkamen, nicht immer auf ungenügende Immunität zurückzuführen sind, weil sowohl während der Impfungen als bei der Untersuchung der Kadaver sehr viele Fälle von Tuberkulose, Diphtherie und besonders von Eileiterkrankheiten nachgewiesen werden konnten.

Weiter dürfen, nach der Impfung, die allgemein geltenden Maszregeln gegen ansteckende Krankheiten (Desinfektion, Absonderung, u. s. w.) nicht vernachlässigt werden, weil durch die Impfung wohl der Ansteckungsstoff *in* den Hühnern be-

kämpft wird, aber nicht der Ansteckungsstoff in den Ställen und auf den Höfen.

Tiere, welche durch individuelle oder andere Umstände ungenügend durch die Impfungen immunisiert worden sind, würden dadurch bald wieder einer neuen Infektion ausgesetzt werden.

Auch darf man in dieser Hinsicht nicht auszer Acht lassen, dasz mit Rücksicht auf die Dauer der passiven Immunität nach der Serumimpfung bei dieser Krankheit noch nicht viel bekannt ist, weshalb einer Serumbehandlung besonders der Wert beigelegt werden musz eines direkt wirkenden Mittels um die Krankheit während der ersten Zeit zum Stehen zu bringen. Dagegen werden die Tiere, welche infiziert werden während der Periode, in welcher das eingespritzte Serum noch nicht im ihrem Körper anwesend ist, vielleicht eine dauernde Immunität bekommen und offenbar ist die Anzahl Tiere, die während der genannten Periode infiziert wird, nicht gering.

THE INFLUENCE OF ANORGANIC ANTIMONY-COMPOUNDS ON TRYPANOSOMES IN THE ANIMAL-BODY.

BY

M. D. HORST.

First assistant of the Laboratory for Comparative Pathology at the Leiden University.
(Director Prof. Dr. D. A. de Jong.)

Before coming to the proper subject of my lecture it seems necessary to speak a few words about trypanosomes in general. They were first seen by VALENTIN in 1841 in the blood of a brook-trout. Gruby in 1843 gave them their name derived from the greek verb trupao (to bore) according to their lively boring movement.

Many species have been discovered since, in warm as well as in cold blooded animals, but it was only when the ominous part they play as agents of infectious diseases was found out, that they raised an interest all over the world.

They are grouped under the protozoa, the unicellular animals and nowadays most authors accept the classification of Döflein who places them among the Plasmodroma, class Mastigophora, underclass Zoomastigina, order Protomonadinae, familie Herpetomonadidae, underfamily Trypanosominae, genus Trypanosoma. They posses a single flagellum which arises posteriorly, adjacent to a blepharoplast or kinetic nucleus. The flagellum forms a margin to an undulating menbrane and ends as a free flagellum at the anterior end of the body.

Since Werbitzky succeded, by the aid of a pyronin treatment, in cultivating trypanosomes without blepharoplasts, it must be acknowledged that the latter is not essential for the life of the protozoon.

There is a great morphological difference between some genera, no difference at all between others, and the same as to their biological characters, but all are obligate parasites or commensals in the body fluids of the higher animals and transported from one host inanother by bloodsucking insects.

On examining the Leiden rats, I found trypanosoma lewisi in nearly every middle-aged specimen of decumanus that came to hand, just the same at Balik-Papan (Borneo,) in marked

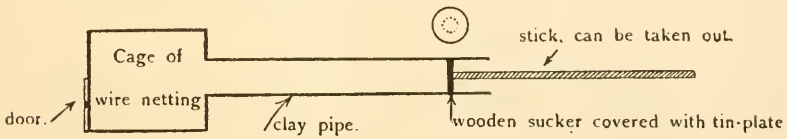


Fig. 1. Cage for Mus Decumanus

contrast with my experience at Pladjoe (Sumatra) were I never saw Trypanosoma in rats, neither in Mus Decumanus, nor in Mus Rattus.

I did not use the Leiden trypanosomes for my experiments, the rats being wild and said to die soon in captivity, though I must mention the fact that I kept many of them alive for at least one year in a cage that allows them to live in the dark and undisturbed. (fig 1).

They are however difficult to handle and narcotics are inevitable.

Professor Dr. D. A. DE JONG possessed two strains of trypanosomes, received some four years ago from the Pasteur Instute at Paris, by the kindness of Professor MESNIL. They were since kept in guinea-pigs. When arriving, the first strain tryp. brucei (ngana) killed a mouse in four days, the second, tryp. equiperdum (dourine) in about six weeks.

As you know the trypanosoma brucei is the parasite that causes the disease called in Central Africa »Ngana« that made Livingstone loose so many of his draught-beasts. Another name for it is tsè-tsè-disease, the virus being transmitted by the tsè-tsè flies, (glossina morsitans).

Dourine, caused by trypanosoma equiperdum, befalls chiefly horses and takes a far more chronical course than ngana. As nowadays both our strains kill mice in about four days I doubt wether really the dourine strain is still in our possession.

Some authors describing trypanosoma equiperdum give a very characteristic morphological detail, the posterior end of some specimina being divided. We never saw this in our parasites. As to the dimensions there seems to be but little difference.

Moreover their dimensions differ in different hosts.

During a recent stage at the Leyden School of Tropical Medicine, Mr. A. KUYER, dutch colonial medical officer, measured over a hundred specimens of both our strains, following the sheme of Lingard and found the following dimensions:

Tryp. brucei: length in m. M. without flagellum 12.65; with flagellum 19.43

Tryp. strain D: length in m. M. without flagellum 14.19; with flagellum 21.20.

Tryp. lewisi: length in m. M. without flagellum 17.84; with flagellum 23.03.

The complement-fixation test being a group reaction, is not fit to distinguish between two species. A much better method is the crossed-immunity test. An animal that survives after being infected by a certain species of trypanosomes gains an immunity generally for a certain time. It can however be killed by another species of trypanosoma.

I had the chance to find a cat that survived an infection with ngana after having been severely ill. When she had completely recovered I infected her with the other strain, after wich she died in ten days.

Still I dare not say that the strains are different it being possible that two strains of trypanosoma brucei from the same source get very different in virulency.

In consequence I shall speak of ngana and the D strain. These curves (fig. 2) show you the time in wich guinea pigs succumbed to the infection. You see that the virulency was increasing.

The animals show no symptoms at all in the beginning, though trypanosoma may be seen in the blood after a few days.

A short time before the fatal end they are getting restless and trembling. There is loss of appetite and a pronounced emaciation, the head is swollen. Sometimes short before death the posterior extremities are paralysed. The blood is anaemic, flows from a wound much easier than usually and contains an incredible number of parasites.

Rabbits show a more chronical form of the disease. Only at certain fever periods the parasites are to be found in the blood, often in great numbers short before death.

As first symptom I noticed a swelling of the head. Then follows conjunctivitis, iritis often with hypopyon, rhinitis. Ulceration of the testes is frequent in the males. Loss of hair first round the eyes is always present and emaciation adds to give the animal a most pityfull aspect.

Still some cases take a much faster course and kill the rabbit before all the symptoms have shown themselves.

At a postmortem examination the organs seem very little altered. A big spleen is always to be found and microscopically except the alteration of the blood and the presence of trypanosoma in the blood everywhere, only a perivascular in filtration round the minor vessels in certain parts of the central nervous system.

As I told you already the trypanosomes are not always to be found in the perepheral circulation. Between two fever periods it is however possible to detect them by injecting a sufficient quantity of the suspected blood into mice rats or dogs, which will promptly develop the disease. This is the way how to make sure wether an animal has been cured or not, though anyhow it is necessary to wait a long time after the symptoms disappaered.

As you know experiments with trypanosomes have been made in almost every country by the most competent workers, but it was Ehrlich who in the Speyer House at Franfort a/M took experiments on the largest scale and in the most systematic way.

Before Ehrlich chemotherapeutical questions were principally studied to find a relation between the chemical structure of a curtain stuff at one side, the alteration of the physiological functions of the body, caused by that stuff, on the other. This method gave very good results for symptomatic therapeutics, leading to the discovery of many fever remedies as salicylate of soda, aspirine, phenacetine, antipyrine ant others, besides many soporofics.

Ehrlich, basing himzelf on his earliest work in tissue-staining tried to find out the distribution of different drugs in the different tissues and during this study conceived the idea that drugs

can only act in the body when chemically bound to the cellular protoplasma. On this axiom was founded the side-chain theory.

So if a stuff is to be found that kills the parasites in the body of their host, it must have affinity tho the cellular protoplasma of the parasites and not to that of the host, it must be parasitotrope and not or less organotrope.

This is the case with many curative sera that act only at the corresponding bacteria and as Ehrlich expresses himself, like a kind of magical bullets hit always and only their aim and nothing else.

So of all curative methods the serum method is by far the best one, but in many cases of infection, especially with higher organised parasites, a strong and durable immunity is not to be got.

It is therefore necessary to look for chemical agents to kill those parasites, but then always arises the difficulty that the remedy less or more affects the protoplasma of the infected body itself.

To make the medicament less organotrope and more parasitotrope by changing its chemical constitution, is the task that comes next and was succesfully fullfilled with the organic arsenic compounds, turning out at last the wellknown salvarsan.

To decide in trypanosomiases whether a certain remedy cures ore not, experiments with living animals are indispensable and of course can be made in different ways.

Ehrlich advised to try a cure of the first attack of the disease, with a dose as large as possible. This is the therapia sterilisans magna. The following attacks are much more difficult to deal with, than the first one, a fact we know to be the same with the treatment of tertian malarial fever, where big doses of quinine often bring about a real cure in the beginning while a less intensive treatment leads to relapses that are influenced by quinine treatment but not easely thouroughly cured.

There are two reasons for this, first the production of new forms of the parasite, the gametes, second that the parasites themselves acquiesce a power of resistance against the drug, just like the human body can get accustomed to a certain extent against arsenic or alkaloid poisoning.

In such cases an other remedy must be used and so during my station at Balik Papan (Borneo) I sometimes succeeded in

curing a tertian malarial fever with only one injection of salvarsan, when full doses of quinine even injected intramuscularly, had failed.

Except the forming of gametes, things are the same with trypanosomiases as far as arsenic compounds are concerned, thus leading to a combined treatment of arsenic with other medicaments.

It is a very interesting fact from the biological point of view that arsenic resistant strains of trypanosoma loose their resistant power, when propagating by sexual, anisogamous processus in the rat louse, haematopinus spinulosus.

Further difficulties in chemotherapeutic experiments arise from the difference that exists between differant strains of parasites as to their sensibility for chemical agents, the same with the laboratory animals. Further the difference in virulency of different strains.

As antimony follows arsenic in the periodic system of elements, it is easily understood why it was chosen for treatment in protozoal diseases. It forms the same oxygen compounds as the arsenic.

The salts in general are hardly soluble in water, except tartar emetic. On the animal or human body antimony salts act almost in the same way as the arsenic salts.

Too large doses cause vomiting and profuse diarrhoea. The bloodvessels of all abdominal organs are overfilled with blood, most probably by laming of the splanchnical nerves. Then follows depression of the central nervous system, heartweakness, collaps.

Albumen and epithelial casts are to be found in the scantily secreted urine and after a short time follows the end.

It is important to know that, when the grave symptoms have set in there is no chance anymore that the patient will recover.

The more chronical form of the intoxication shows a gradual loss of power an ever increasing decline, owing to a fatty degeneration of the liver, the kidneys, the muscles and degeneration of the ganglia in the spinal cord.

The elimination takes place for the greater part through the kidneys and as Professor Dr. L. VAN ITALLIE (Leyden) showed, much slower than the elimination of arsenic. He examined the water of a patient treated with tartar emetic by KAYSER and me for venereal granuloma and saw the elimination still going on weeks after the last injection.

Keeping in view the facts already mentioned and knowing too, that the toleration for antimony is not always the same in differents individuals, it is easily understood that antimony, though already used as a remedy by the Arabs and the Greek, was for a long time discredited.

Till the sixteenth century it was praised as a panacea against a lot of diseases, especially against syphilis. Then the academies of Paris and Heidelberg forbode its use, too many cases of poisoning by antimony being recorded. And now it has come to glory again.

It was MESNIL who first recommended its use against protozoal diseases.

PLIMMER and THOMPSON introduced it in the treatment of trypanosomiases.

GASPAR VIANNA made use of it in cases of venereal granuloma and espundia., CASTELLANI in the tropics and CARONA in Europe gave it against kala azar. CASTELLANI prescribed it already a long time against yaws, our framboesia tropica, combined with salicylate of soda and iodide of potassium, the so called yaws mixture.

In Holland it was first given by KAYSER and me in a case of venereal granuloma and by BENJAMINS against espundia.

It is generally injected into the blood, though mixtures and even external application are not without having effect.

Mostly tartar emetic is chosen.

From an article by GREIG in the Indian Journal of Medical Research, I see that in British India very large doses are given. First 2 cc of a one percent solution in sterile salt water, then every day increasing doses till even 12 cc a day and 125 cc in 20 injections, within 29 days.

This is a very strong treatment. KAYSER and I injected a one tenth per cent solution with a three or four days interval and after 27 days, having injected 820 mgrs were obliged to stop for a while, signs of kidney-irritation setting in.

An exact examination of the water every day is necessary to avoid danger.

Especially in Leishmanioses it is a brilliant cure but let us not forget that the remedy is not only parasitotrope but also

organotrope and that the toxic dose is not much larger than the curative one. [1])

My own experiments were taken with guinea-pigs and rabbits. First I used tartar emetic, a one percent solution in sterile salt water. The results I show you in these curves (fig. 2).

I treated the animals with big doses, with small doses, with long and short intermissions, but the result was the same, all died after a longer or shorter illness. Still it is possible to prolong their life for months and this experience showed me that is was possible to keep the strains alive with less costs than before.

I simply treat the animals with just as much tartar emetic as is sufficient to keep them alive, the trypanosomes returning regularly in the peripheral circulation.

For guinea-pigs the dose is about 0,5—0,75 pro 100 grams, for rats about the same.

Very soon, sometimes ten minutes after the injection the parasites disappear from the blood and no doubt the greater part is distroyed. Some specimina however seem to escape. This leads us to expect that the remedy does not reach them and it would be interesting to know wether the antimony penetrates into the spinal fluid or not.

Of course all kinds of antimony compounds have been tried.

As a rule found by CLOETTA and BRUNNER (Zürich) the three worthy compounds are very parasitotrope and very organotrope, the five worthy compounds just the reverse, but there is one exception, the Sb_2O_3, antimony trioxyde.

This white powder showed in the hands of KOLLE a good remedy and not very dangerous for laboratory animals.

It must be observed that in former publications on this subject, for in stance of SOLEWEITSHUK, quite the contrary was maintained.

KOLLE easily succeeded in curing mice from trypanosomiasis by injecting a compound mixture of stibiumtrioxyde and after him HOFMANN published very remarkable results obtained with rabbits, infected with ngana and dourine, having cured all his animals with only one injection, containing from 40—100 mgrs. of $Sb_2 O_3$.

---

[1]) We just received a letter from our patient that he was entirely cured.

80 and 144 died of intercurrent disease.

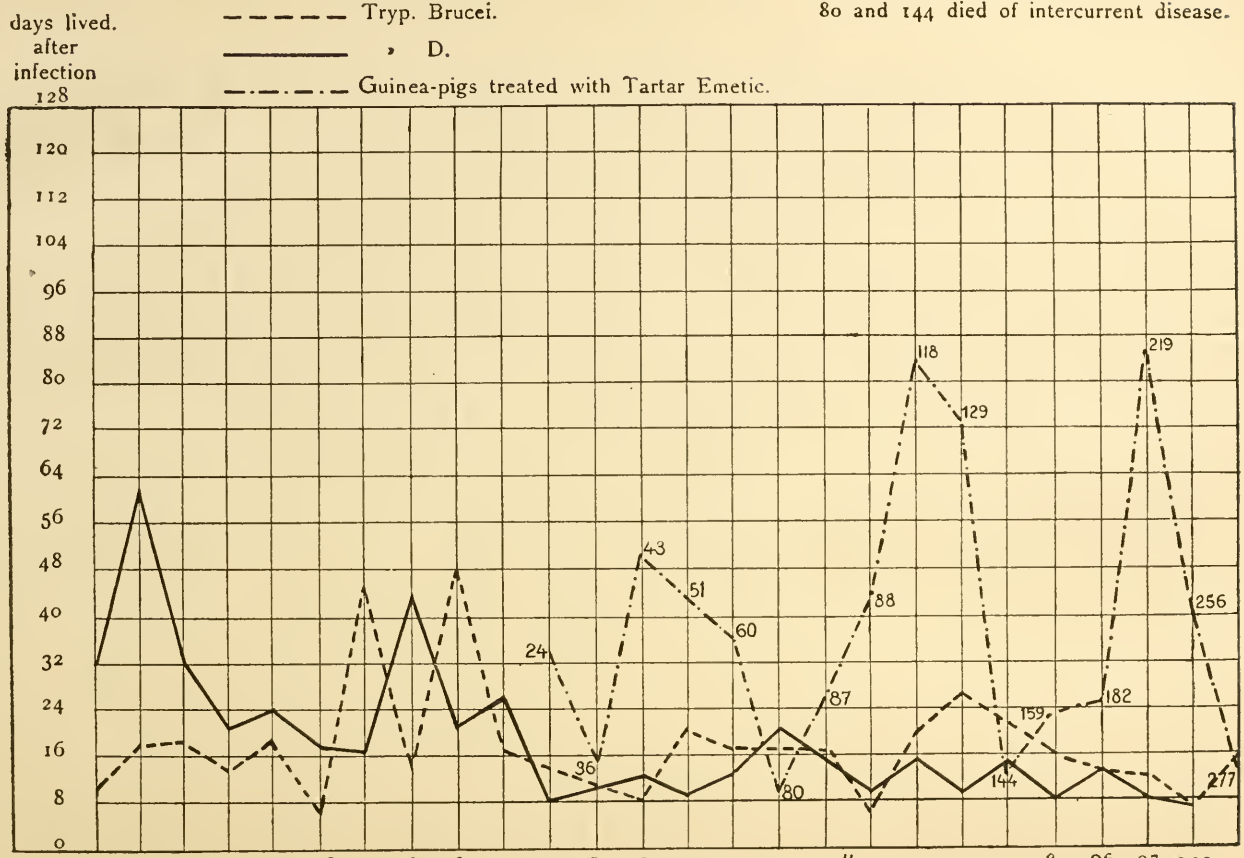


Fig. No. II.

The powder was mixed up in sirupus simplex (pharmacopoea helvet.) 100, pulvis gummi arab 7,5, carefully mixed in a mortar and sterilised at 120° Celsius for fifteen minutes. Usually in one cubic cM. were mixed 150 mgrs. of Sb_2O_3.

Before injection in the marginal vein the mixture must be warmed for two or three minutes in boiling water in order to drive the air out for fear of embolus. During this time the oxyde will not precipitate.

Professor Dr. F. A. H. SCHREINEMAKERS (Leiden) was so kind to give me a sufficient quantity of pure Sb_2O_3 for which I duly thank him here. Though my results were not so succesfull as HOFFMANN'S I still succeeded in curing 2 rabbits out of 9 with only one injection, a real therapia sterilisans magna.

One or two days after the injection the animals seem to be very ill and then very soon recover.

I observed them for at least six months, several times injected their blood into mice but they never showed signs of trypanosomiasis anymore.

Without doubt this remedy has a very remarkable influence on the parasites, but its insolubility is a great drawback.

A certain quantity of the mixture is always left in the syringe making the dosage inaccurate. Then there is the chance of embolic processus setting in, either in the marginal vein itself, or much more dangerous in the capillary vessels of the lungs.

Embolus in the marginal vein was followed bij necrosis of a great part of the external ear, accompanied by an inflammatory process that once led to septicaemia and always made the animals very ill.

In one case (121) death followed on the fifth day after the injection. At the postmortem examination the lungs showed numerous haemorrhagic infarcts, due to capillary embolus with the trioxyd mixture. Dr. H. J. Montagne (Leiden) was so kind to make a chemical analysis et the lung in question and found about 4 mgrs of Stibium in one of the lobes.

The remedy was already patented under the name of trixidine. It seems to me that it ought to betested on larger animals.

A soluble compound would be far more preferable, and will probably to be found among the organic compounds, about which I hope to speak to you at another time.

RECORDS.

Ngana.

106. Rabbit. Weight 2170. 3rd April. Infected with ngana from cat 201. 11th April weight 1395. Tryp. in the blood. Looks very ill and sleepy. 7,5 mgr Sb 203 in mixture intravenous. The rabbit does not move, is very short of breath. Dies 12th April. In both lungs pneumonic centres, pieces of this tissue sink in water. Spleen enlarged and soft. Tryp. in the blood in great numbers, a very acute case. No influence of the drug.

121. Rabbit. Black. Weight 1750. 12th April infected with ngana from cat 201. 18th April no tryp. 2th May. weight 1800. No tryp. Very sleepy. Head swollen, conjunctivitis in right eye. 31st May panophthalmitis right eye. Weight 2200. In five bloodfilms no tryp. 12th July in 20 films no tryp. 40 mgr. Sb 203 in mixture, intravenous. 17th July dies. Post Mortem. Loss of hair especially on the nose, round the eyes and in the ears. On the bald spots bloody crusts. Testes partially necrotic. Swollen glands in the armpits and the groins. Liver small, yellowish. Spleen en larged, soft. Kidneys swollen. Suprarenal capsules normal. Lungs swollen, dark red, almost black, with white netting on the surface. Heart normal, abdomen normal. Microscopical, haemorrhagic infarcts in the lungs, suspension visible. Stibium in the parenchym of the lungs. (Dr H. J. Montagne) Illustrates the dangerous side of this treatment.

155. Rabbit. Weight 1820. 30th April infected from rat 137. 30th May. weight 1920. Head bald, conjunctivitis on both eyes. Tryp. in the blood. 6th June. Weight 1720. 40 mgr Sb_2O_3 in mixture under the skin of the abdomen. 14th June. Dies. Enlarged spleen. No othther alterations. No tryp.

239. Rabbit. Weight 2200. 16th August infected from cat 198. 30th August blood injected into a mouse. Mouse remains healthy. 3rd September infected from guinea-pig 154. 23rd October weight 2270. Tryp. in the blood. Eyelids swollen, loss of hair. sleepy. 30th October weight 1890. 20 mgr Sb_2O_3 in mixture intravenous. Dies after a few days. No tryp.

246. Rabbit, white. 2900. 24th August infected from cat 198. Infected again 3rd September from guinea-pig 154. 20th September 3000. gr. Tryp in the blood. 40—60 mgr Sb_2O_3 in mixture into marginal vein.

21st September. Looks very ill. Eyelids swollen, sleepy, seems to suffer from itching all over the body. Thrombotic processus of the marginal vein, whole ear is swollen, red, partially necrotic, black. 25th September much better. 6th October worse. 8th October dies. Post mortem. Lesions at the head still present. Hypostasis in the left lung. Liver large and dark coloured. Heart and kidneys pale, spleen not enlarged. In liver and blood no tryp.

248. Rabbit. Brown and white, 2820. 24th August infected from cat 198. Infected again from guinea-pig 154. 3rd September tryp. in the blood. Weight 3050. 40—60 mgr Sb_2O_3 in mixture into the marginal vein. 20th September a little dull. 25th September improves. 23rd October allright. *Cured.* **)

211. Rabbit. Grey. 14th December infected from rat 330. Has formerly been treated with cholera-vaccin. 25th January no tryp. 4th February blood injected into a rat 39. 9th February rat shows tryp. in the blood. 3th February symptoms appear. 40 mgr Sb_2O_3 in mixture intravenous. Symptoms rapidly disappear.

They come back in the beginning of June. Conjunctivitis on both eyes. Loss of hair round the eyes. Several mice infected at different times with the blood of the animal remain sound. Cured from trypanosomiasis? *)

50. Rabbit 19th March infected from rabbit 34. 13th March blood injected into a mouse. 18th March mouse dies of trypanosomiasis. 19th March about 40 mgr Sb_2O_3 in mixture intravenous. 17th April dies. Brown white spots in the lungs.

Strain D.

152. Rabbit. 2200 gr. 26th April infected from guina-pig 129. 31th May, head swollen, sleepy. Weight 2080 gr. (4 June. Blood injected into guina-pig. 16th June guinea-pig trypanosomes. At the same day in five bloodfilms of the rabbit no trypanosomes) 6th July 40 mgr. Sb_2O_3 in mixture into marginal vein. Head swollen, loss of hair round the eyes. Conjunctivities 10th July Looks much better. Right eye allright. Feeds well. 18th July. Looks much better, two necrotic spots in the right ear over marginal vein. 18th August, looks allright. Weight 2200 gr. Loss of hair totally repaired. 24th August. Blood injected into a rat. Rat remains healthy. 20th September Allright. Still living. *Cured.* **)

---

*) Not cured. At the end of June a mouse injected with the bloods develops the disease.

**) Cured signifies lived without symptoms for more than half a year. Blood injected into mice of rats never caused trypanosomiasis in the latter.

Guinea-pigs. Tryp Strain D. Tartar. Emetic.

Number.	Weight in grams.	Dose in milligrams.	Interval days.	Total dose.	Necrosis or not.	Illness in days.	Days between injection and injection.	End.	Trypanosomes or not.	Notes.
24	600	6+6	6	+12	+	33	8+++	†	—	
36	350	3,5+5	9	8,5	—	14	3+	†	—	
43	340	5+5	5	10	—	51	5+++	†	—	
51	300	5+5+5+2+2	4+6+29+3	19	—	44	14+++	†	—	Infected, two times
60	380	5+5	4	10	+	30	4+++	†	—	
80	320	5	—	5	—	9	8	†	—	Interval bleeding
87	?	5+5+5	5+4+6	15	—	26	9	†	—	
88	?	5+5	4	10	—	43	12	†	—	Pneumonia
118	520	2+1+1+1+1+1+3+1	4+3+4+3+3+9+10	11	—	84	9++++	†	+	
129	400	2+2+2+2+2+2	4+7+14+7+9	12	—	73	5+++	†	+	
144	370	2	—	2	—	13	13++++	†	+	
159	500	2+2+3+2	7+5+6	9	—	22	8++++	†	+	
182	530	2+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1	2+1+1+1+1+1+1+1+1	11	—	25	12+++	†	+	
219	720	5+5	20	10	—	35	7+++	†	—	
256	450	3+3+3	10+19	9	—	41	6+	†	—	
277	490	3	—	3	—	14	10+++	†	+	
			Ngana.							
119	430	2+2+2+2+2+2+2+2+2	5+5+18+29+14+20+15+9	18	—	143	10+++	†	+	
120	450	2,5+2,5+2,5+2,5+2+2+2+2+2	4+6+12+10+8+10+14+20	22	—	116	8+	†	?	Pneumonia
154	380	2+2+2+2+2+2+2+2,5+2,5+2,5+5+2+2	6+6+8+8+18+14+20+15+10+11+16	28,5	—	151	9++++	†	+	
					—	108	10+++	†	—	
162	650	3+1+1+1+1+1+5+5+5	6+3+12+16+14+20+15+10	23						
179	540	3	--	3	—	27	12+++	†	+	
255	370	2,5		2,5	—	16	16++++	†	+	

† = death. + = 2—3 trypanosomes in one field. ++ = 5—8 tryp. in one field.
+++ = 10—30 tryp. in one field. ++++ = innumerable in one field.

LITTERATURE.

G. L. Hoffmann. Chemotherapeutische Studien über die intravenöse Verwendung von Antimontrioxyd bei experimentellen Trypanosomen Infectionen. Zeitschrift f. Hyg. u. Infect. Bd. 80.

E. D. W. Greig. Observations on the Effect of Intravenous Injections of Antimonium Tartaratum on Malarial Parasites. The Indian Journal of Medical Research. Vol. 5. Nr. I. July 1917.

Dr. Claus Schilling. Chemotherapeutische Versuche bei Trypanosomen Infectionen. Archiv f. Schiffs- und Tropenkrankheiten. Bd 13.

Broden et Rodhain. Traitement de la Trypanosomiase humaine. Ibidem.

S. Prowazek. Kritische Bemerkungen zum Trypanosomenproblem. Ibidem.

Dr. B. Eckart. Ueber therapeutische Versuche gegen die Trypanosomiasis des Menschen. Ibidem.

Dr. Jos Schilling, Prof. Dr. Claus und Jaffe. Weitere chemotherapeutische Versuche bei Trypanosomenkrankheiten. Ibidem.

L. J. Morgenroth und L. Halberstädter. Zur Kenntniss der Artzneifestichkeit der Trypanosomen. Archiv f. Schiffs- und Tropenkrankheiten. Bd 15.

Dr. A. Nissle. Weitere Studien über die Ursachen der Pathogeninät und der Heilmittelwirkung der Trypanosomeninfectionen. Ibidem.

Dr. Helm. Heilung von Trypanosomiasis in zwei Fällen. Ibidem.

Laveran et Mesnil. Les Trypanosomiases.

B. T. Terry. Chemotherapeutic Trypanosome studies with special reference to the immunity following cure. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research.

P. Ehrlich. Dass Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus.

» Grundlage und Erfolge der Chemotherapie.

» Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen.

» Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie.

» Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie.

M. Herzog. Disease-Producing Microorganisms.

Fantham, Stephens and Theobald. Animal Parasites of Man.

Vrijburg. Over Trypanosomen. Lezing gehouden in de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Tropische Geneeskunde. 31 October 1915.

C. S. Jeronimus. Proevèn met arsenicum en arsenicumpreparaten tegen surra en piroplasmose bij groote huisdieren.

A. Castellani. The British Medical Journal October, 1916.

Soleweitshuk. Archiv. f. Experimentelle Pathologie u. Pharmacologie. 1880.

R. van Saceghem et E. Nicolas. L'émétique dans le traitement des trypanosomiases. Bull. de Soc. de Soc. Path. Exotique. Nr. X. 1916.

M. Cloetta. Untersuchungen über das Verhalten der Antimonpräparate im Körper und die Angewöhnung an dieselben. Archiv. f. Exper. Path. u. Pharm. 1911.

O. Brunner. Über die Beziehungen der chemischen Konstitution zur pharmacologischen Wirkung bei Antimonpräparaten. Ibidem 1912.

And many others.

PÉRIODIQUES ET LIVRES REÇUS:

Tijdschrift voor vergelijkende geneeskunde. (Réd. Prof. Dr. D. A. de Jong). Leyde. T. III, fasc. 3 et 4, T. IV, fasc. 1.

Mededeelingen uit het geneeskundig laboratorium te Weltevreden. Feestbundel, uitgegeven ter gelegenheid van de opening van het nieuwe geneeskundig laboratorium te Salemba, Weltevreden, Batavia.

The Journal of medical Research. (Ed. H. C. Ernst). Boston, Vol. 38, No. 1—3.

Revista del Instituto Bacteriologico del departemento nacional de higiene. Vol. I, No. 1—3. Buenos-Aires.

Tropical diseases Bulletin. 1918. London.

RECTIFICATION.

A cause de notre analyse du Tome XIII des Oeuvres de Chr. Huygens (c. f. la livraison précédente, p. 54), le Professeur D. J. Korteweg nous écrit, qu'il n'est pas le seul auteur de l'Avertissement. La partie a plus considérable en est sortie de la plume du Professeur Lorentz, tandis que M. M. van de Sande Bakhuizen, Beijerinck, Swellengrebel et feu M. Straub ont collaboré, chacun dans son domaine (resp. astronomie, microbiologie et ophthalmologie), au résultat très remarquable que représente cette édition.

Le Journal „Folia Microbiologica" publie des articles originaux, principalement de microbiologistes hollandais, des revues générales et c. q. de la bibliographie, mais non pas des analyses d'autres journaux. Les articles d'étrangers ne sont pas exclus.

Les travaux paraissent en français, allemand ou anglais. Le journal publie e. a. le compterendu des séances de la Société Néerlandaise de Microbiologie.

Les auteurs reçoivent gratuitement 50 tirages de leurs articles.

Le Journal paraît en fascicules 2—3 fois par an. Le prix du volume d'environ 300 pages avec illustrations et registre, pour ceux qui ne sont pas membre ordinaire de la Société Néerlandaise de Microbiologie) est de fl. 12.— (frais de poste non compris).

Les articles que l'on désire publier dans les „Folia Microbiologica" peuvent être adressés à un des membres de la Rédaction.

The Journal „Folia Microbiologica" contains original articles, primarily by Dutch microbiologists; further general reviews, and eventually reviews of books, but no ordinary reference. Contributions from foreigners are not excluded.

The articles are published in English, French or German.

The Periodical publishes a. o. the transactions of the Dutch Microbiological Society.

Authors receive 50 copies of their articles gratuitously.

The Periodical appears serially, in 2—3 numbers a year, at irregular intervals. The subscription-fee for a volume of ± 20 sheets of printed matter, with illustrations and register is *f* 12.— (not post free).

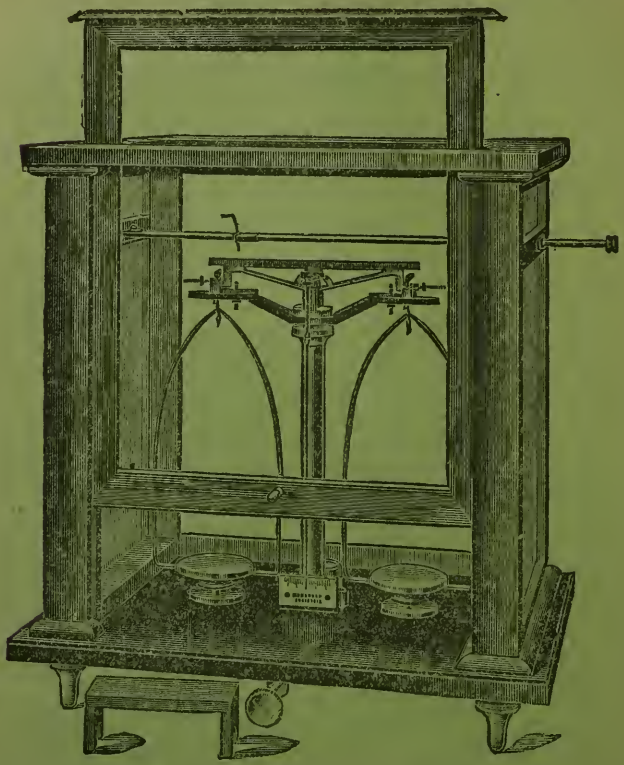
(For non ordinary members of the Dutch Microbiological Society).

Articles, to be published in the „Folia Microbiologica", may be sent to any of the editors.

BECKER'S SONS

BRUMMEN (GELDERLAND).

FILIAAL: VAN BRAKELSTRAAT 29a.



ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN- EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN VAN BESTUUR, ENZ. ENZ.

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHEIDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY

FOLIA MICROBIOLOGICA

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR MIKROBIOLOGIE.

REDACTIE:

A. KLEIN, GRONINGEN.
J. POELS, ROTTERDAM.
J. G. SLEESWIJK, DELFT.

DEEL V, 3. SLOTAFLEVERING. (SEPTEMBER 1919).

REDACTIE EN ADMINISTRATIE:
PHOENIXSTRAAT 18, DELFT (HOLLAND).

NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP
: VOORHEEN :
: J. C. TH. MARIUS :
GANZENMARKT 4-10, UTRECHT
SPECIALITEIT:
INRICHTING EN COMPLETEERING VAN WETENSCHAPPELIJKE LABORATORIA

MICROSCOPEN EN NEVENAPPARATEN VAN CARL ZEISS TE JENA EN R. WINKEL TE GÖTTINGEN

MICRO-PHOTOGRAPHISCHE EN MICRO-PROJECTIE-APPARATEN
OP AANVRAGE WORDEN CATALOGI TOEGEZONDEN

INHOUD.

Pag.

J. G. LE RÜTTE. Der Verderber der Garnelenkonserven und seine Eigenschaften 143

H. WIGGER BOELENS. Die quantitative Reaktion von Wassermann 156

G. KAPSENBERG. Die quantitative Wassermansche Reaktion 166

Die Zeitschrift „Folia Microbiologica" veröffentlicht Originalarbeiten, an erster Stelle von holländischen Mikrobiologen; weiter zusammenfassende Uebersichte und event. Buchbesprechungen, aber keine gewöhnliche Referate. Die Mitarbeit von Ausländern ist nicht ausgeschlossen.

Die Arbeiten erscheinen in der deutschen, französischen oder englischen Sprache. Die Zeitschrift veröffentlicht u.A. die Verhandlungen der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie.

Autoren erhalten 50 Abdrücke ihrer Artikel kostenfrei.

Die Zeitschrift erscheint in zwanglosen Heften 2—3 Mal Jährlich. Der Band von ± 20 Bogen mit Abbildungen und Register kostet (für nicht gewöhnliche Mitglieder der Holländischen Vereinigung für Mikrobiologie) *f* 12.— (erhöht mit Portokosten).

Arbeiten zur Aufnahme in die „Folia Microbiologica" sind bei einem der Herren Herausgeber einzusenden.

(*Aus dem Hygiënischen Institut der Technischen Hochschule in Delft: Direktor Prof. Dr. J. G. Sleeswijk.*)

DER VERDERBER DER GARNELENKONSERVEN UND SEINE EIGENSCHAFTEN.

VON

Ir. J. G. LE RÜTTE, chem. Ing., Konservator am Institut.

Wenn man versucht aus dem Meere stammende Schaltiere, ins besondere Garnelen durch eine einfache Erhitzung bei Temperaturen höher als die, welche man bei der Pasteurisation verwendet, haltbar und für den Gebrauch verwendbar zu machen, so wird dies fast niemals gelingen. Bei einer solchen Behandlung der Garnelen in Konservenbüchsen oder Sterilisiergläser tritt nach wenigen Tagen ein übeler Geruch und eine Gasbildung auf, wodurch das Produkt ganz ungenieszbar und schädlich für die Gesundheit wird. Die Büchse bombieren durch diesen Vorgang und die Sterilisiergläser öffnen sich selbstverständlich durch die sich entwickelnde Gase.

Ich habe mich bemüht, die Ursache dieser Erscheinungen nach zu spüren, da es zuerst von groszer Bedeutung ist eine Konservierungsmethode aus zu finden, welche gute Resultate gibt und weil es zweitens umzweifelbar von wissenschaftlichen Standpunkt die Mühe lohnt, die Verderber der Garnelen zu isolieren und ihre Eigenschaften zu studieren.

Bei Anwendung einer ungenügend hohen oder dauernden Erhitzung konnte ich immer nur *eine* Art thermostabile Bakteriën isolieren. Diese Mikrobe zersetzt die Konserven in der Weise, daśz jeder Genusz unmöglich wird. Die Farbe der frischen Garnelen wird umgewandelt in eine fahlgraue und die Masse bekommt, auszer einem Geruch nach faulendem Eiweisz, eine weiche, schleimrige Konsistenz. Es ist nicht schwer ans solchem Material

22 1948

eine Reinkultur der genannten Mikrobe zu züchten. Auf gewöhnlichem Nähragar oder in Bouillon entsteht schon nach zwanzig Stunden bei 37 ° C. ein üppiges Wachstum von langen, schmalen Stäbchen, die, wie zu erwarten war, schon bald Sporen bilden.

Aus verschiedenen Teilen der Niederlande, sowohl aus der Nordsee, als aus der »Zuyderzee«, konnte ich auf dieser Weise immer nur die selbe, sporenformende Bakterienart kultivieren. Da nun die Eigenschaften, dieser Mikrobe von denjenigen der mir bekannten bis jetzt beschriebenen Arten genügend abweichen, um von einer neuen Art sprechen zu können, so habe ich versucht fest zu stellen, ob diese Bakterie auch aus anderen, aus dem Meere stammenden Material zu züchten war, oder ob diese Mikrobe nur der Garnele inhärent war. Verschiedene Seefische und Schaltiere (Muscheln, Krabben u. s. w.) wurden ungenügend erhitzt und in derselben Weise behandelt wie die Garnelen. Bei diesen Untersuchungen kann man schon voraussagen, dasz in vielen Proben die Mikrobe anwesend sein wird, denn es ist ganz natürlich dasz manche Fische und andere Meeresprodukte in Berührung kommen mit Garnelen, oder met infiziertem Meeressand und andrem Material — wenn man nämlich annimmt, dasz diese Bakteriën nur gehören bei den Garnelen und den sehr nahestehenden Schaltieren. Aufserdem ist es von allgemeiner Bekanntheit, dasz die Konservierung von Fischen und Fischteilen, welche weit aus der Küste und aus groszer Tiefe gefangen werden, keine besondere Schwierigkeiten verursacht. Daher ist es also wahrscheinlich, dasz die hier in Frage stehende sporenformende Bakteriën nur in der Nähe der Küste vorkommt und dasz man nicht mit einer reinen Meeresbakterie zu tun hat.

Die Resultate meiner Untersuchungen stimmten mit meiner Erwartung gänzlich überein. Bei vielen Konserven fehlte die genannte Mikrobe und bei denjenigen, bei welchen eine Infizierung nicht ausgeschlossen war, konnte die Bakterie einige mahlen isoliert werden. Kann man also nicht mit aller Sicherkeit feststellen, dasz die Bakterie nur von der Garnelen stammt, *dasz zie immer die Garnelen begleitet, steht ohne Zweifel fest.* Auf grund mancher Erwägungen, habe ich nicht gezögert diese Mikrobe nach dem Geschlechtsnamen der Garnelen und der Krabben zu benennen. In diesem Artikel wird also, wenn von

Bazillus Crangonicus«, die Rede ist der sporenformende Verderber der Garnelenkonserven gemeint.

Morphologie.

Wie oben schon erwähnt wurde, besteht der Bazillus aus langen schmalen Stäbchen, die in jungem, auf gewöhnlichem Nähragarge züchtet 1 bis ± 3 μ lang sind. Die Stäbchen erreichen eine gröszere Länge, wohl bis 3 μ wenn die Kulturen älter werden. Die normale Breite beträgt ± 0,5 μ. Lange Fäden werden oft gebildet, besonders in flüssigen Kulturmedien; aber auch die frisch isolierte Bakterie bildet lange Fäden auf festen Nährboden, wie Agar-agar. Die Gliederung der Fäden ist meistens nicht zu sehen; nur eine sehr sorgfaltige und schwache Färbung mit Methylenblau gestattet dann und wann die Abgrenzung der einzelnen Stäbchen wahr zu nehmen. Die Enden der Bazillen sind schwach abgerundet und die Körper verschieden stark gekrümmt oder ganz gerade.

Das Bild der neu isolierten Kulturen zeigt sehr regelmäszige Formen. Die Stäbchen sind alle ziemlich kurz, und, abgesehen von mehreren Fädenketten, oft in Reihen parallel neben einander angeordnet. Nach fortgesetzter Impfung zeigt sich jedoch in mikroskopischen Bilde eine gröszere Variabilität; längere und kleinere Stäbchen liegen dann willkürlich durcheinander.

Färbbarkeit.

Diese Bakterie läszt sich leicht mit den übligen Anilinfarbstoffen wie Methylenblau, Methylviolett und Fuchsin färben. Durch diese Färbung, gelingt es oft, besonders wenn man sehr schwache Lösungen von Methylenblau anwendet und sehr vorsichtig in der Kälte arbeitet, manche Granula sichtbar zu machen. Diese Körnchen, spielen meines Erachtens eine grosze Rolle beim Prozesz der Sporenbildung (siehe später). Bei älteren Kulturen werden diese Granula mehr differenziert und es wird leichter sie unter dem Mikroskop zu erkennen. Die degenerierte und abgestorbene Stäbchen in alten Kulturen sind homogen und sehr schwach gefärbt. Die Granula sind dann nicht mehr zu sehen.

Sporenbildung. Das Bild, einer fünf oder sechs Tage alte Agarkultur, welche bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden ist, zeigt nach Färbung mit Methylenblau eine Menge von

verschiedenen Individuen, die man oberflächlich nicht als zu einer Gattung gehörend betrachten würde. Es scheint mir von groszer Bedeutung näher auf diese Sache ein zu gehen.

Man kann also verschiedene Formenarten unterscheiden, von welchen die Folgenden die wichtigsten sind:

1. Stäbchen mit einer sehr stark prononzierten segmentalen Färbung. 2. Stäbchen, welche nur polär gefärbt sind. 3. Individuen, die wie 2, poläre Färbung zeigen, in der Mitte jedoch angeschwollen sind, wodurch eine Art Clostridium entsteht. 4. Homogen gefärbte Stäbchen, die auch in der Mitte eine Anschwellung zeigen. 5. Homogen gefärbte Stäbchen, die an einem Ende angeschwollen sind. 6. Ovale Gebilde, die in der Periferie stark gefärbt sind und zwei gefärbte Körner an jedem Ende besitzen. 7. Stark lichtbrechende ründlich-ovale Individuen, augenscheinlich nur aus einem gefärbten Ring bestehend. 8. Ein ovaler Ring, wie 7, aber von mehr gestreckter Form.

Die letztere Form kann ohne weiteres für eine erwachsene Spore angesehen werden, namentlich weil diese Form in alten Kulturen am meisten vorkommt. Diese 8 Übergangsstadien vom Stäbchen bis zur Spore kann man ohne Schwierigkeit immer bei älteren Kulturen wahrnehmen. Läszt man die Kulturen bei höheren Temperaturen stehen, so treten die verschiedenen Stadien früher auf; bei 37° C. oft schon nach 48 Stunden. Umgekehrt bleibt die Sporulation aus, selbst nach mehreren Wochen, beim Aufbewahren bei Eisschrank-Temperaturen. Man hat auf Grund dieser Tatsache das Recht, an zu nehmen, dasz die niedrigen Temperaturen für die Lebensbedingungen dieser Bakterie nicht schädlich sind; dasz diese Bakterie also bei solchem Temperaturen zu leben gewöhnt ist, was übereinstimmt mit ihrem Fundort im Meere und mit der Kaltblutigkeit der Garnelen. Nicht in Überinstimmung hiermit ist aber das Temperatur-optimum der Bakterie, das bei ungefähr 37° C. liegt.

Es ist mir nicht mit aller Sicherkeit gelungen, den genauen Verlauf der Sporulation vom Stäbchen bis zur reifen Spore nach zu weisen, denn ausgenommen in ganz jungen kulturen, was es mir nicht möglich Praeparate herzustellen, worin sich *nur* Individuen von *einem* bestimmten mikroskopischen Aussehen befanden. Schon nach wenigen Tagen treten manche

Fig. 1.

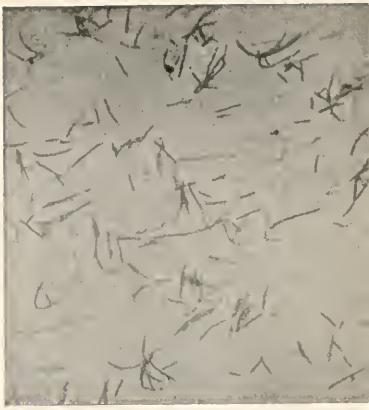


Fig. 4.

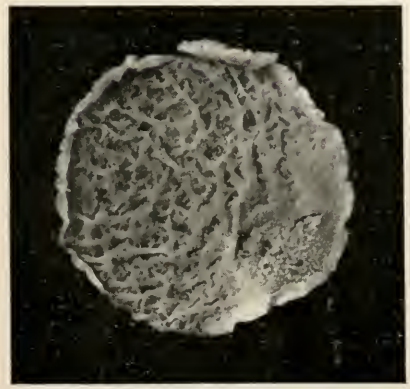


Fig. 2.

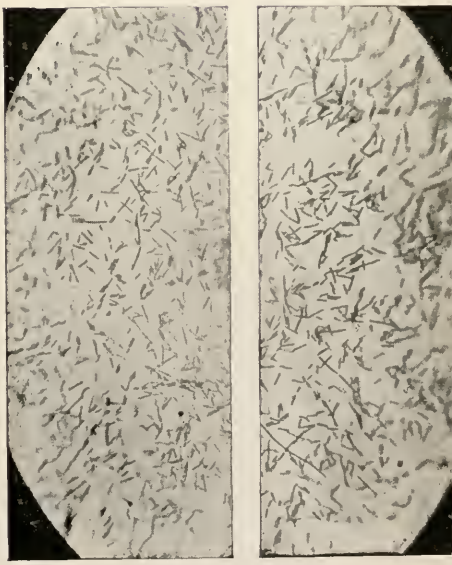


Fig. 3.

Fig. 5.

Fig. 8.

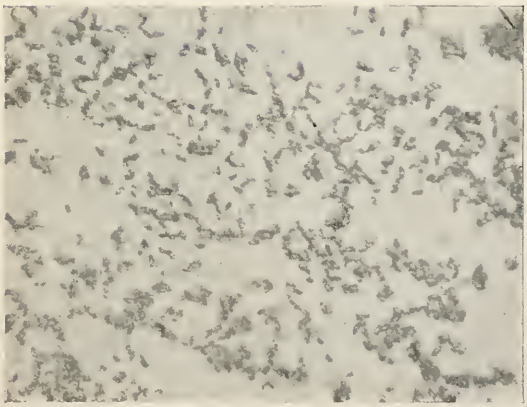


Fig. 6.

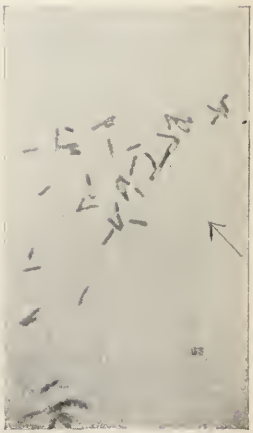


Fig. 7.

Formen zugleich auf. Einige Stäbchen sind dann schon ganz zu einer Spore ausgebildet, während ettliche Zwischenformen ebenso anwesend sind.

Ich habe, mit Benutzung der von mir festgestellten Tatsache, dasz die Sporulation bei niedrigen Temperaturen wenig energisch ist, erstens versucht die Sporenbildung zu verzögern bezw. zu hemmen, durch Aufbewahrung bei Temperaturen zwischen 0°—37° C. Zweitens durch kultivieren auf Nährböden, denen viel Kochsalz zugezetzt worden war z. B. 10 % Na Cl. Wirklich wird die Sporenbildung dadurch erheblich verzögert. Eine bessere Einsicht in die einander folgenden Zwischenformen, die bei der Sporulation auftreten, konnte ich hierbei aber nicht erlangen. Immer blieben manche Formen neben einander in denselben Praeparaten zugleich bestehen. Jedoch, auf Grund vielfacher Studierung dieser Objekte, möchte ich eine wahrscheinliche Hypothese aufstellen, die auch mit Rücksicht auf anderen Tatsachen, als die richtige angenommen werden kann.

In Kulturen, welche sehr viele Sporen aufweisen, kommen oft Formen vor, bei welchen die stark gefärbten Granula nicht mehr gleichmäszig im Körper der Bazillen gelagert sind. Man kann im Gegenteil vielfach bemerken, dasz sie einen bestimmten Ort bevorziehen und daselbst angehäuft sind. Dadurch bleiben schwachgefärbte Teile im Stäbchen übrig, wo die Granula in früheren Stadien sich befanden. An diesen Stellen werden die künftigen Sporen sich bilden.

Häufen die Granula sich an *einem* Ende des Bazillus, so wird die Trommelschläger-oder Racketform 5 entstehen; häufen sie sich an *beiden* Enden auf, so bildet sich Form 4. Bei weiterer Entwicklung des Prozesses zerfältt das Gewebe der stark gefärbten Stäbchen. Dies zeigt sich in Anfange durch die allmählich schwerer werdende Färbbarkeit dieser Teile. Sind diese Stellen fast ganz abgestorben und ist nicht viel mehr als die Sporen übrig geblieben, dann findet sich am Rande der Sporen nämlich an den beiden Polen, noch eene stark gefärbte Stelle, die sich während längerer Zeit als letzte übergebliebene Teil des verfallenen Stäbchen handhaben.

Diese Form 6 bildet sich meistenteils.

Hat sich aber aus dem Bazillus ursprünglich eine Racket- oder Trommelschlägerform gebildet, so sieht man nur an einem

Pole der Spore ein solches Gebilde erhalten. Auf die Dauer verfallen auch diese stark gefärbten Randsteile und die reife Spore zeigt sich unter dem Mikroskop als ein ovaler Ring mit einem stark lichtbrechenden Inhalt.

Ganz merkwürdig ist es, dasz die Racket-oder Trommelschlägerform, die so typisch für diese Bakterie ist, nicht mehr wahrgenommen wird bei mehrfachem überimpfen auf künstlichen Nährböden. Nur in frisch isolierten Kulturen habe ich diesen Form konstatieren können.

Strichkulturen und Kolonien.

Die Strichkultur auf gewöhnlichem Agar-agar-Boden hat ein sehr spezifisches Aussehen. Schon nach ± 20 Stunden 37° C. tritt ein dicker Belag auf von rahmgelber Farbe mit stark welliger Erhebung. Der Zusammenhang des Belags ist so stark, dasz es vielfach schwer fält mit einer Öse material zu lösen zum Überimpfen. Die Konsistenz ist oft häutig und lederartig. Die Plattenkultur auf Agar zeigt aufliegende undurchsichtige Kolonien von verschiedenen Gröszen und mit stark lockiger, haariger Randbeschaffenheit. Oft ergeben sich lange und kurze Ausläufer, welche die Platte ein schönes Aussehen verliehen. (siehe Fig.) Die tiefer liegende Kolonien sind kleiner und zeigen eine runde Form mit nur wenig haarigem Rand.

Auf Gelatin tritt schon Verflüssigung ein bevor die Kolonien ihre normale Beschaffenheit zeigen können. Nur ein einziges Mal kann man ziemlich grosze Ausläufer wahrnehmen. Die Verflüssigung ist schalenförmig einsinkend.

Stichkulturen.

Auch hier wächst die Kultur bei 37° C. in Agar sehr geschwind. Nach 24 Stunden hat das Wachstum sich schon bis zum Boden des Rohres ausgebreitet. Der Stichkanal zeigt horizontale Verzweigungen, welche nach unten kleiner werden, während an der Oberfläche zich vom Stiche aus das für diese Bakterie so typische Häutchen von sehr starken Zusammenhang ausbreitet.

In Gelatin bei 22° C. tritt nach vier oder fünf Tagen Verflüssigung ein. Der Verflüssigungsprozess schreitet aber nur sehr langsam, und gleichmäszig weiter und bildet dabei eine trübe Flüssigkeit, worauf sich ein ähnliches Häutchen wie beim Agar bildet, jedoch von geringer Konsistenz.

Bouillon-Kultur.

Auch auf Bouillon wächst die Bakterie bei 37° C. rasch. Nach 20 Stunden hat sich ein sehr stark zusammenhängendes, waschlederartiges und gekräuseltes Häutchen gebildet, ohne dasz die Flüssigkeit sich merkbar trübt. Das Häutchen, zwischen Filtrierpapier getrocknet, verbreitet in trockenem Zustande einen typischen Geruch von Valeriansäure.

Ein Bodensatz entsteht erst nach längerer Zeit. (Siehe fig.) welche das Bouillonhäutchen, 6 Tage alt vorstellt.

Nach Impfung mit der Bakterie wird die Bouillon schon nach 20 Stunden bei 37° C. stark alkalisch reagierend.

Es spricht von selbst, dasz, ebenso wie auf Agar-agar, die Bakterien in Bouillon bald Übergangsformen und Sporulation zeigen.

Pathogenität.

Dieser Bakterie und ihren Stoffwechselprodukten scheint keine Pathogenität eigen zu sein, denn manche Injektionen von Aufschwemmungen jungerer und älterer Bakterienkulturen und von klarer Bouillon in welcher sich eine Kultur dieser Bakterie entwickelt hat und welche Kultur (Häutchen) mittels einfachen Filtrierens durch Papier entfernt worden war, verursachten bei den Tieren keine Krankheit. Meerschweinchen und Kaninchen wurden subkutan und intraperitoneal injiziert. Kleine und grosze Quantitäten (1 bis 10 cc.) von Bakterien, in physiologischen Salzlösungen suspendiert, wobei ganze Strichkulturen in 10 cc. Flüssigkeit benutzt wurden, zeigten absolut keine schädliche Einwirkung.

Die Tiere blieben alle vollkommen gesund. Auch lokale Entzündungen blieben aus.

Die Annahme dem Bac. Crangonicus die sog. »Garnelenvergiftung« zuzuschreiben, scheint infolge dieser Injektionsexperimente, also nicht haltbar zu sein.

Indolbildung.

Niemals konnte eine Indolbildung bei dem Bac. Crangonicus nachgewiesen werden.

Säurebildung.

Neutrale Lackmuszmolke wird durch den Bac. Crangonicus innerhalb eines Tages auf 37° C. rot gefärbt.

Gramfärbung.

Der Bazillus wird deutlich nach Gram gefärbt.

Aërobie.

Der Bazillus ist aërob, kann aber auch unter anaëroben Bedingungen wachsen. Der Bazillus gibt jedoch immer einem groszen Gehalt an Sauerstoff den Vorzug. Dann ist der Wachstum ein auszerordentlich grösze und energische und das mikroskopische Aussehen ist nur bei Anwesenheit von viel Sauerstoff normal und gesund.

Sporen wurden bei anaëroben Kultren niemals wahrgenommen.

Wachstum auf Garnelen-Bouillon.

Gegen Erwartung wächst diese Mikrobe viel weniger schnell auf Garnelen-Bouillon, als auf einfachem Fleisch-Bouillon. Das Häutchen, dass sich erst nach drei oder vier Tagen bei 37° C. bildet, zeigt auch einen viel geringeren Zusammenhang und is viel dünner. Auch sieht man oft, dasz das Häutchen die Oberfläche des Bouillons nicht vollständig bedeckt und dasz der Garnelenbouillons nicht vollständig bedeckt und dasz der Garnelenbouillon selbst eine ziemlich grosze Trübe aufweist. Wie schon oben erwähnt, bleibt Fleisch-Bouillon fast ganz klar.

Die Sporulation ist hier ebenfalls verzögert und die Reaktion wird, wie zu erwarten war, auch hier stark alkalisch.

Wachstum auf Meerzalzbouillon.

Meersalz, prepariert durch einfaches Trocknen von Meerwasser, wurde in der Konzentration, worin es im Meerwasser sich befindet, in salzloser Fleischbouillon gelöst.

Hier wächst der Bazillus Crangonicus in ähnlicher Weise, wie in und auf Garnelenbouillon; in diesem Falle aber noch weniger intensiv und langsamer, während das Häutchen hier so wenig zusammenhängend ist, dasz man kaum von einem Häutchen sprechen kann. Es ist hier mehr die Rede von Bakteriënklumpen oder Konglomeraten. Auch ist die sich darunter befindende Meersalzbouillon noch starker trübe, wie bei der Garnelenbouillon.

Wachstum auf säuren Nährböden.

Schon kleine Säurekonzentrationen hemmen das Wachstum auf künstlichen Nährböden.

Eine $^1/_{64}$ N. Essigsäurekonzentration verhindert jedes Wachstum und läszt die Nährbouillon ganz klar, sogar nach wochenlangen Aufbewahren bei 37° C.

Eine Säure-Normalität von $^1/_{128}$ möchte ich den *Ubergangssäuregrad* nennen; denn bei diesem Säuregehalt tritt eine

schwache Trübung in der Bouillon ein, mit wenig zusammenhängenden Bakterienhaufen an der Oberfläche, während bei einem Essigsäuregrad von $^1/_{256}$ N. schon nach einem Tage bei 37° C. ein normales Häutchen, ohne Trübung der Bouillon entsteht.

Um die Frage zu beantworten, ob die Säure nur das Wachstum hemmt oder ob sie auch die Sporulation und die Sporenkeimung verhindert, wurde Fleischbouillon angesäuert bis auf $^1/_{64}$ N. Säure, und mit reichlichem Bakterienmaterial geimpft. Bei einer Impfung habe ich nur ganzjunge Stäbchen, ein anderes Mal nur alte, lang aufbewahrten Sporen benutzt.

Eine öfters wiederholte mikroskopische Kontrolle der Kultur zeigte, dasz beide Formen ihr ursprüngliches Aussehen beibehalten, sogar nach 14 Tagen bei 37° C., während die Menge des geimpften Materials augenscheinlich dieselbe geblieben war. Also blieben die Stäbchen nur Stäbchen und handhabten ihren äuszerlichen Karakter. Ebenso die Sporen. Hierdurch war bewiesen, dasz sowohl die Sporulation, wie die Sporenkeimung, durch ein Minimum der Säure gehemmt wird.

Das in dieser Weise behandelte Bakterienmaterial wurde jetzt auf einen neutralen Nährboden übergeimpft. Die Stäbchen und die Sporen verhalten sich dann ähnlich, und beide wachsen normaliter alsob sie nicht mit Säure in Berührung gewesen sind.

Nach 14 Tagen *tötet* eine Säurekonzentration, die jedes Wachstum hemmt, diese Bakterie also nicht. Nach Überimpfung auf neutralen Nährboden, wächst der Bazillus in normaler Weise.

Milch koaguliert nach 5 Tagen (37° C.) und weist dann eine schwach säure Reaktion auf und zeigt keinen unangenehmen Geruch.

Schwefelwasserstoff bildet sich nicht; wohl ein nicht übel riechendes Gas, das nicht näher untersucht wurde und das man bei den Stichkulturen oft wahrnehmen kann.

In *Glukosebouillon* tritt schon bald eine starke Alkalibildung auf. Eine *Gährung* wurde dabei nicht konstatiert; auch bleibt jede Gährung aus bei Anwesenheit von andren Zuckerarten, wie Saccharose, Laktose, Maltose und Fruktose.

Junge Kulturen zeigen eine sehr starke *Eigenbewegung*, welche sich bei älteren Kulturen schon bald verringert.

Mit LÖFFLER'S *Zilienfärbung* konnten die Zilien nur sehr schwer sichtbar gemacht werden. Die Geisseln sind kurz und peritrich.

Mit andren Färbungsmethoden gelang es nie Geisseln nach zu weisen.

Einflusz von *hohen Temperaturen.*

Ebenso wie die ihm nahestehenden Bakterienarten, hat der Bac. Crangonicus eine sehr grosze Resistenz gegen Erhitzung.

Meine Experimente haben die folgenden Resultate gegeben:

Junge Kulturen (15—20 Stunden alt) *ohne Sporen.*

Erhitzung	1/2	St.	auf	80° C.	tötet nicht.
»	3/4	»	»	80° C.	» »
»	1	»	»	80° C.	» »
»	1/4	»	»	85° C.	» »
»	1/2	»	»	85° C.	» »
»	3/4	»	»	85° C.	» »
»	1	»	»	*85° C. tötet.*	
»	1/4	»	»	90° C.	tötet nicht.
»	1/2	»	»	*90° C. tötet.*	
»	1/4	»	»	*95° C. tötet.*	

Alte Kulturen mit *Sporen* (Altertum 14 Tage).

Erhitzung	1	St.	auf	85° C.	tötet nicht.
»	3/4	»	»	90° C.	» »
»	1/4	»	»	95° C.	» »
»	1/2	»	»	*95° C. tötet.*	

Die Erhitzung wurde in offenen und auch in zugeschmolzenen Röhrchen vorgenommen in einem Wasserbad. Die Lebensfähigkeit wurde durch Überimpfung auf gewöhnlichen Nährböden wie Agar-agar und Fleischbouillon kontrolliert.

Aus den obenstehenden Ziffern ergibt sich, dasz nicht nur die Sporen sondern auch die jungen Bakterien sehr viel Widerstand zeigen gegenüber hohen Temperaturen. Nach widerholten Experimenten, wobei mit Bakterienmaterial gearbeitet wurde, dasz dreimal mit Zwischenbrutperioden von 15—20 Stunden übergeimpft wurde, um möglicherweise aus den älteren Kulturen mitgeimpften Keime zu entfernen, wurden dieselben Resultate erzielt.

Bei einer Erhitzung von *1 Stunde* ist also die *niedrigste* Temperatur, wobei die Bakterien vernichtet werden: *85° C.*

Wachstum auf Salzagar.

Es ist nicht ohne Bedeutung, die Eigenschaften des Wachstums bei einem Mikroorganismus festzustellen unter Bedingungen, die soviel wie möglich denjenigen des ursprünglichen Milieus ähnlich sind. Der Bac. Crangonicus, aus dem Meere isoliert, wurde also kultiviert auf Nährböden von groszem Salzgehalt und zwar auf Agar-agar mit 1, 2 und 3 % Chlornatrium. Anfangs gibt es kein Unterschied im mikroskopischen Aussehen. Nach 24 Stunden zeigt sich, wie auf 0.85 % NaCl-haltigem Agar, ein starkes Wachstum von einförmigen Stäben. Die Strichkultur ist aber nicht stark zusammenhängend, wie oben beschrieben, und ist mittels einer Platinnadel leicht zu entfernen, und zeigt eine spiegelglatte Oberfläche (siehe fig. 8–II). Nach 40 Stunden auf 37° C. tritt eine grosze Anzahl Sporen auf, viel mehr wie auf 0.85 % NaCl-Agar] und schon nach 2 × 24 Stunden sind keine Stäben mehr zu sehen; nur ganz reife Sporen (ovale, stark lichtbrechende Gebilde) sind anwesend. Die Sporulation wird also durch NaCl stark gefördert. Sehr deutlich zeigt sich dieses bei 2 und 3 % NaCl.

Gröszere Konzentrationen, wie 5 % NaCl und 10 % NaCl hemmen im Gegenteil die Sporulation. Z. B. treten die Sporen bei einem Gehalt von 10 % NaCl erst nach 10 Tagen sparsam auf, während das Wachstum der Stäbchen normal ist.

Es ist merkwürdig, dasz stark sporenhaltiges Material, auf z. B. 3 % Agar gewachsen und nachher mehrfach auf 0.85 %-NaCl übergeimpft, während längerer Zeit die Eigenschaft behält, sehr bald Sporen zu bilden, wozwischen sich völlig reife, polär gefärbte, und Racketförmige Sporen finden.

Diese Eigenschaft möchte ich andeuten mit dem Namen:

»*Salzkarakter*« des Baz. Crangonicus. Nach vielfacher Überimpfung auf gewöhlichen Nährböden erlangen die Kulturen wieder ihre normalen Eigenschaften zurück.

Eine Erklärung für diese Tatsache liegt nach meiner Meinung darin, dasz die auf stark salzhaltigen Böden gewachsene Mikroben genügende Mengen NaCl in ihren Körpern anhaufen, dasz ihre Abkömmlinge noch genügend Salz in ihren Körpern enthalten um den »Salzkarakter« zu zeigen. Damit erklärt sich ebenfalls die Tatsache, dasz der »Salzkarakter« nur allmählich verschwindet.

Eine zweite Merkwürdigkeit des Wachtstums auf 3 % NaCl Agar ist die folgende: Eine mehrmalige Überimpfing auf 3 % NaCl-Agar, zeigt immer nach 2 oder 3×24 Stunden *nur* Sporen, *keine* Stäbchen. Impft man aber nach Brutperioden, welche kurzer sind als 20 Stunden, auf 3 % Nacl-Agar, dann entstehen *nur* Stäbchen und *nie* Sporen oder Übergangsformen. Die völlige Sporulation tritt nach 2×24 Stunden auf, wobei nie eine aequatoriale Sporenbildung (wie beim Baz. Subtilis) wahrgenommen worden ist.

Eine *grosze* Salzkonzentration bewirkt also eine *eingreifende Veränderung* in den Eigenschaften dieser Bakterie.

Der Bazillus Crangonicus hat einen sehr varierenden Karakter. Nach langen Wachstum auf künstlichem Nährböden ändern sich die Eigenschaften. Diese Variationen treten auch bei nahestehenden Bakterienarten auf, z. B. bei den von DUCKWALL isolierten Stämmen (*Konserven Zeitung*, 1904), die ihre Resistenz gegen höheren Temperaturen bei fortgesetzter Kultivierung verlieren.

Es ist nicht ohne Bedeutung hier die Untersuchungen von PERUANSKY zu vermelden »Ueber die Bakterienflora des Fischdarms und ihre Beziehung zu den Fischvergiftungen und Fäulnisvorgängen«, (Inaugural-Dissertation, Heidelberg 1912.) Seine Schluszsätze ergeben, dasz im Darminhalt der lebenden Fische sowohl aerobe wie anaerobe Bakterienarten vorkommen. Die aeroben Bakterienarten sind zum Teil identisch mit Bakterien, die als Bewohner des Fluswassers bekannt sind, wie z. B. Bac. fluorescens liquefaciens, Bac. aquatilis communis (Flügge); zum Teil gehören sie der Coligruppe an. Proteusarten fanden sich nicht. Im Darm lebender Fische lieszen sich anaerobe Bakterien

nachweisen: Bac. putrificus (Bienstock) und Bac. postumus (Würcker).

Eine Identifizierung dieser aeroben Arten mit meinem Bac. Crangonicus ist natürlich ausgeschlossen. Die anaeroben Arten zeigen jedoch eine auszerordentliche äuszere morphologische Ähnlichkeit. In der Inaugural Dissertation WÜRCKER's, (Erlangen, 1910, »Ueber Anaerobiose«) können die sehr schönen Abbildungen des Bac. putrificus Bienstock und Bac. postumus fast für Bilder des Bac. Crangonicus gelten. Die Verschiedenheit der Eigenschaften (siehe die genannten Dissertationen), besonders die ausgesprochene Anaerobie dieser Würckersche Bakterien gegenüber die starke Neigung zum Sauerstoff des Bac. Crangonicus, schlieszen Identität der beiden Arten aus. Auch die Plankton-expedition hat in der Tiefe des Meeres keine ähnliche Bakterienarten aufgefunden.

(Dr. B. FISCHER. Die Bakterien des Meeres nach dem Untersuchungen der Plankton-Expedition, 1894. Kiel und Leipzig—V. LIPSIUS & FISCHER.)

Ein *Literaturverzeichnis* findet sich in der genannten Dissertationen WÜRCKER's und PERUANSKY's. Wegen Raummangel möchte ich darauf hinweisen.

Erklärung der Figuren von Baz. Crangonicus.

Fig. 1. Wachstum, ausläufer und einzelne Kolonien auf gewöhnlichem Agar. Natürliche Grösze.

Fig. 2. Bakterienhäutchen, gewachsen auf gewöhnlichem Bouillon. 6 Tage Alt. Natürliche Grösze.

Fig. 3. Kultur, 20 Stunden alt, auf gewöhnlichem Agar. Vergröszerung ± 1000 fach.

Fig. 4. Ältere Kultur auf gewöhnlichem Agar. Vergr. 1000 fach.

Fig. 5. Kultur auf gewöhnlichem Agar. 14 Tage Alt.

Stäbchen, Sporen und Übergangsformen. 1000 fach.

Fig. 6. Polärgefärbte Übergangsformen auf gewöhnlichem Agar. 1000 fach.

Fig. 7. Raketähnliche Sporen auf gewöhnlichem Agar. 1000 fach.

Fig. 8. Strichkultur auf gewöhnlichem Agar (I)

Strichkultur auf 3 % NaCl haltigen Agar (II). Natürliche Grösze.

DIE QUANTITATIVE REAKTION VON WASSERMANN. [1])

VON

H. WIGGER BOELENS (*Haag.*)

Um mit Hülfe des Ergebnisses der Wassermannschen Reaktion den Einfluss der Behandlung verfolgen und gleichzeitig auch die verschiedenen luetischen Sera mit einander vergleichen zu können, machte sich das Bedürfnis nach einer quantitativen Ausführung dieser Reaktion fühlbar.

Diese bezweckt also, die Stärke der positiven Wassermannschen Reaktion zahlenmässig auszudrücken.

Zu den Ansprüchen, die in Bezug auf die Zuverlässigkeit der Methodik an diese Reaktion gestellt werden müssen, kommen nun noch folgende, die darin bestehen, dass:

1°. die Stärkeziffer mit Genauigkeit festzustellen ist, und

2°. die so erhaltenen Ziffern eine gegenseitige Vergleichung zulassen.

In der folgenden, von mir im Jahre 1914 angegebenen Methode [2]), die seitdem einzelne geringe Abänderungen erfahren hat, sind auch diese beiden Forderungen berücksichtigt worden und in sehr vielen Fällen, deren Anzahl in die Tausende geht, ist ihre Brauchbarkeit für die Praxis erwiesen.

Grundlage der Methode.

Die W. R. ist eine Komplement-Bindungs-Reaktion, und wir nennen das Ergebnis der Reaktion ein um so stärkeres, je nachdem die aus dem Patientenserum und dem Extrakt bestehende Kombination, das Komplement (K.) in grösserer Menge

1) Im vorigen Jahre wurde in einer Versammlung der Niederländischen Vereinigung für Mikrobiologie die Frage der quantitativen Ausführung der Wassermannschen Reaktion behandelt. Dr. van Hasselt behandelte die Sormanische Methode und Dr. Wigger Boelens die von ihm selbst angegebene. Erstere dürfte aus der Literatur genügend bekannt sein, letztere wird hier von Herrn W. B. selbst beschrieben. Die in der genannten Versammlung von Dr. Kapsenberg geübte prinzipielle Kritik bringen wir ebenfalls zur Publikation *Die Redaktion.*

2) Arbeiten aus dem Untersuchungsamt des staatlich-hygienischen Zentral-Instituts in Utrecht. Jahresbericht 1914.

spezifisch festgelegt hat. Mit anderen Worten, die Stärke der positiven S e r a lässt sich in der Menge K ausdrücken, welche sie bei Vorhandensein von Extrakt maximal binden können.

Für die Vergleichung von Reaktionen, die nicht mit demselben K ausgeführt worden sind, müssen nun aber die übrigens recht geringen Unterschiede in der Aktivität der gebrauchten Komplemente berücksichtigt werden. Dies kann dadurch geschehen, dass man das K. im Vorversuch mittels eines konstanten Faktors austitriert, in casu die sensibilisierte Hammelblut-Körperchen Aufsschwemmung.

Kurz gesagt wird also die Menge K. welche durch die Gebrauchsdoses Serum plus Extrakt gebunden werden kann, gemessen, während das Mass, mit welchem das geschieht, jedesmal dadurch vorher geaicht wird, dass das K. austitriert wird.

Besprechung der Methode.

Die fünf Agentien, die bei der W. R. zusammenwirken, bilden gewissermassen zwei Gruppen:

Die indikatorische Gruppe: Haemolytischer Ambozeptor, Hammelblutkörperchen-Suspension und Komplement.

Die spezifische Gruppe: Serum, Extrakt und Komplement.

In der indikatorischen Gruppe ist der haemolytische Ambozeptor praktisch gesprochen konstant und ebenso die Hammelblutk.-Suspension (wenn sie bestimmten, noch näher zu erörternden Forderungen entspricht). In der sensibilisierten Hammelblutkörperchen-Suspension besitzen wir also einen für jede Ausführung der W. R. sich selbst stets gleichbleibenden Faktor und unter Berücksichtigung desselben bestimmen wir die Aktivität des K., d. h. wir bestimmen im Vorversuche diejenige Menge K., die für die Haemolyse der Gebrauchsdosis dieser Suspension nötig ist. Hierbei wird, durch Hinzufügung der Gebrauchsdosis Extrakt, dessen K.-Absorption in Rechnung gebracht, welche bei Gebrauch des Polyvalenten-Extraktes übrigens gering und konstant ist (Siehe unter: Ausführung der Methode). Die so gefundene Menge K. ist unsere K.-Einheit.

In der spezifischen Gruppe werden Serum und Extrakt in konstanter, gleichbleibender Dosis gebraucht, das K. dagegen in einer Reihe aufeinanderfolgender Verdünnungen, und zwar unter Zugrundelegung der gefundenen K.-Einheit.

So könnte eine Gebrauchsdosis Serum plus eine Gebrauchsdosis Extrakt zusammen gebracht werden mit einer Gebrauchsdosis K., welche die K.-Einheit in 1, 2, 3-facher u. s. w. Menge enthält. Empirisch hat sich ergeben, dass bis 20 K.-Einheiten von einigen stark-luetischen Seris spezifisch gebunden werden können.

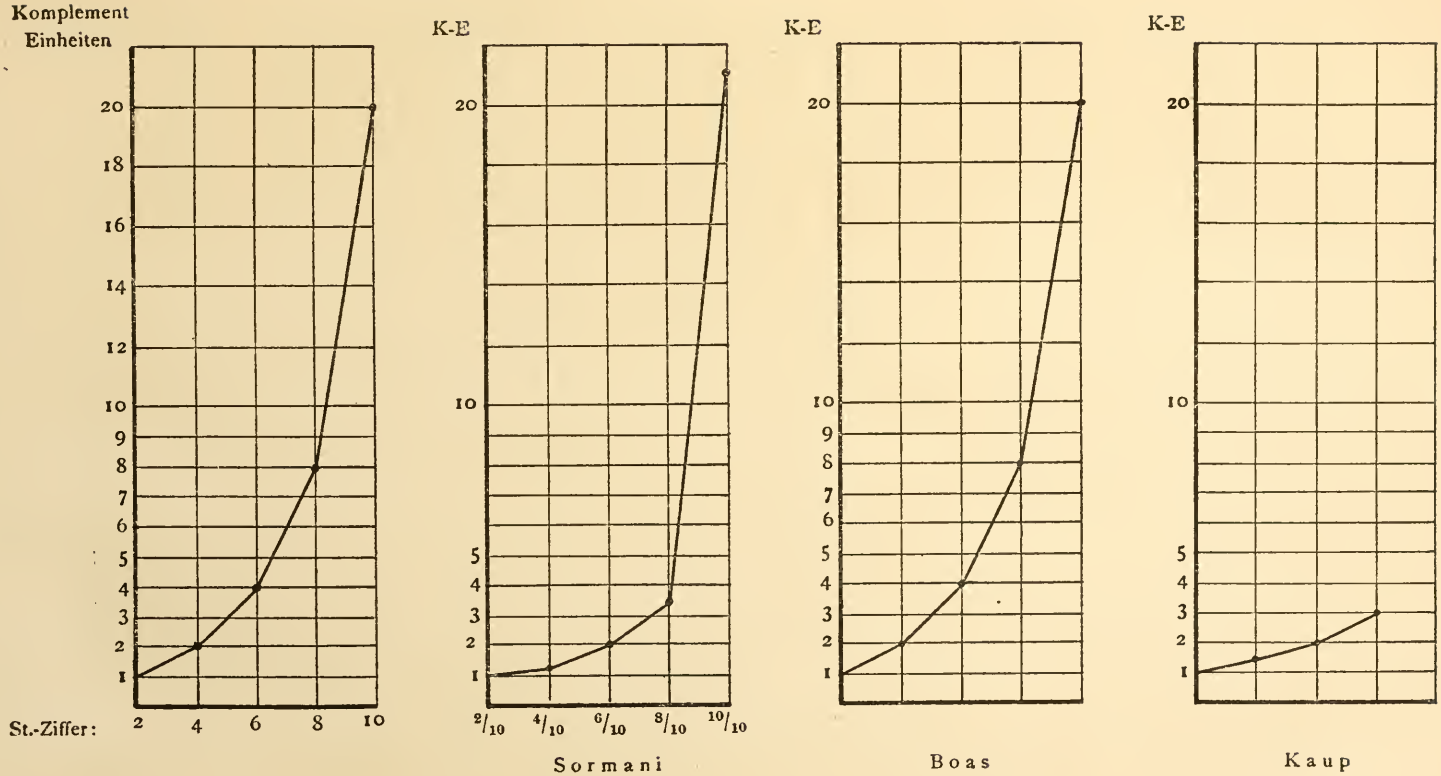
Anstatt dieser etwa 20 K.-Verdünnungen gebrauchen wir aus praktischen Erwägungen nur 5 und zwar so, dass sie per Gebrauchsdosis 1, 2, 4, 8 und 20 K.-Einheiten enthalten und wählen bei völliger Bindung dieser Menge (wodurch in dem betreffenden Reagensglase völlige Hemmung entsteht) die Stärkeziffer 2, 4, 6, 8, oder 10, während eine weniger vollkommene Bindung (wobei sich in dem betreffenden Reagensglase teilweise Haemolyse einstellt) mit den Ziffern 1, 3, 5, 7, oder 9 angedeutet wird.

Vergleichung mit anderen Methoden.

Jeder der drei Agentien der spezifischen Gruppe kann, in Verdünnungen angewandt, zu einer quantitativen Ausführung der W. R. dienen. Wenn man entweder das Serum oder den Extrakt verdünnt, so wird damit bezweckt, in jedem weiteren Reagenzglase eine Kombination von Serum und Extrakt zu bekommen, die in geringerem Masse, als die ihr vorhergehende Kombination, K binden kann: es ensteht demnach, trotz der Beifügung derselben Menge K. bei jeder folgenden Verdünnung ein immer grösser werdender relativer K.-Überschuss.

Sormani gebraucht beispielsweise 0,21, 0,16, 0,11, 0,06 und 0.01 eines spezifischen Extraktes bei gleichbleibendem Serum und derselben K.-Menge. Theoretisch entsteht also ein relativer K.-Überschuss, der die im ersten Reagenzglase vorhandene Menge, um das 1,3, 2, 3,5 und 21-fache übertrifft; es ist demnach gerade als ob Serum und Extrakt-Doses gleichbleiben, jedoch resp. 1, 1,3, 2, 3,5 und 21 K-einheiten beigefügt werden.

Boas nimmt 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 und 0,01 Serum bei gleichbleibenden Mengen Extrakt und Komplement. Theoretisch würde das damit übereinstimmen, Serum und Extrakt-Dosis unverändert zu lassen, bei einer Zunahme der K.-Mengen von 1, 2, 4, 8 bis 20 Einheiten.


Komplement Einheiten
20
18
16
14
12
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
St.-Ziffer:
2
4
6
8
10
K-E
20
10
5
4
3
2
1
2/10
4/10
6/10
8/10
10/10
Sormani
K-E
20
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Boas
K-E
20
10
5
4
3
2
1
Kaup

Die beigefügten Kurven geben eine Vergleichung der K.-Skala, die in der Methode Sormani und Boas theorethisch entsteht, mit der, welche in meiner Methode wie in der Kaup'schen vorliegt, welche letztere bei gleichbleibendem Serum und gleichen Extrakt-Dosen, die 1, 1½, 2 und 3 fache K.-Einheit anwendet.

Diese Skala stimmt bei der Methode-Boas ganz mit der meinigen überein; bei der Methode-Sormani gibt sie eine starke Abstufung in den schwach-positiven Seris gegenüber einer geringeren Abstufung in der stärkeren, whärend sie bei der Kaup'schen Methode die etwas stärker-positiven Sera nicht umfasst.

Tatsächlich fand Van Hasselt, dass da, wo meine Methode als Stärkeziffer 2 gibt, Sormani $^{2}/_{10}$, $^{3}/_{10}$ oder $^{4}/_{10}$ unterscheidet, während $^{8}/_{10}$ nach Sormani mit 7, 8 oder 9 nach meiner Methoder übereinkommen kann.

Dieses einfaches Schema nun wird durch die verschiedenen Eigenschaften der Extrakte verwischt, welche überdies bei der Serum-Verdünnungs-Methode in jedem folgenden Reagenzglase von einer anderen Menge Serum beeinflusst werden, wie auch von der bei positiven Sera so oft vorhandenen Selbsthemmung, welche bei der Extrakt-Verdünnungs-Methode den relativen Ueberschuss des K. verringert. Dies erschwert einesteils das Ablesen und zwar weil sich die spezifische Hemmung über mehrere Reagenzglaeser erstrecken kann, während anderenteils (und das ist ein sehr grosses Hindernis), die gegebene Ziffer zu hoch ausfällt.

Eine noch grössere Schwierigkeit bei der Extraktverdünnungs-Methode liegt in der Tatsache, dass die in nicht spezifischen Extrakten vorhandene Menge des Antigen im Verhältnis zu der Menge, welche das am stärksten positive Serum in seiner Gebrauchsdosis maximal binden kann, in solchem Überflusse vorhanden ist, dass dies die Wirkung geringer Verdünnungen, (wie Sormani sie anwendet), illusorisch macht.

Bei beiden Methoden ist das von Reagenzglas zu Reagenzglas wechselnde gegenseitige Verhältnis zwischen Serum und Extraktmenge kein idealer noch erwünschter Zustand; sie ist die Quelle der Nachteile, die ihnen anhaften.

Am meisten logisch wäre es denn auch, von einer Dosis

Serum plus einer Dosis Extrakt auszugehen, diese zu mischen und diese Mischung 2, 4, 8 mal u. s. w. zu verdünnen, um dann jeder Verdünnung eine Einheit K. zuzufügen. Es würde dann in jedem folgenden Reagenzglase ein proportional wachsender relativer K-Überschuss entstehen: ein Verhältnis also, als ob wir Serum und Extrakt gleich liessen, von dem K. aber 1, 2, 4, 8 usw. Einheiten gebrauchten.

In meiner Methode kommt dieses Prinzip vollkommen zu seinem Recht, während in der Steigerung der K-Mengen der Praxis Rechnung getragen wird. Da, wo mit dem Komplement sparsam verfahren werden muss, ist jedoch die Variation meiner Methode sehr gut zu gebrauchen, bei der Serum plus Extrakt gemischt werden und diese Mischung 2, 4, 8 und 20-fach verdünnt wird, wonach jeder Verdünnung 1 Einheit-K. zugesetzt wird.

Ausführung der Methode.

Vorschriften für die Reaktionskomponenten.

Als physiologische Kochsalzlösung wird eine Lösung von 9 Gramm NaCl in einem Liter Aqua dest gebraucht.

Hammelblutkörperchen-Suspension.

Das frische defibrinierte Hammelblut wird dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und jedesmal 20 Minuten kräftig ausgeschleudert. Zum Schlusz wird die obenstehende klare Flüssigkeit völlig abpipettiert, das Sediment gut geschüttelt und davon eine 5 pCtige Aufschwemmung gemacht. Diese enthält dann ungefähr 900.000 rote Blutkörperchen per cbmm.

Haemolytischer Ambozeptor:

Vorzugsweise wird ein Ambozeptor mit einer Titerstärke von 4000 gebraucht, worunter zu verstehen ist, dass eine Verdünnung von 1 auf 4000 unter Anwendung von 1/10 K in zwei Stunden völlige Haemolyse mit der Gebrauchsdosis Hammelblutkörperchen-Suspension gibt.

Sensibilisierte Hammelblutkörperchen-Suspension.

Die Hammelblutkörperchen-Suspension kommt nur sensibilisiert zur Anwendung. Ganz wie nach Sormani wird dies dadurch erzielt, dass man sie eine Stunde bei Bruttemperatur mit ebensoviel Ambozeptorlösung zehnfacher Titerstärke zusammen bringt; Nochmaliges wachsen der so sensibilisierten Blutkörperchen ist unnötig.

Komplement.

Den Vorzug verdient eine Mischung einiger Sera, die von gesunden männlichen Meerschweinchen stammen, was bei der Blutentnahme mittelst eines Saugaparates aus einer Ohrmuschelwunde keine Schwierigkeiten bereitet. Es wird frisch d. h. am selben Tage gebraucht.

Extrakt.

Es wird nur ein Extrakt gebraucht und zwar ein polyvalenter, wovon eine 20 % Emulsion in der Weise hergestellt wird, dasz die benötigte Menge Kochsalzlönng unter stetigem Schütteln tropfenweise zugefügt wird. Dieser von mir eingeführte Extrakt [1]) wird dadurch bereitet, dass von verschiedenen Exemplaren von Menschen-, Rinder- und Meerschweinchenherzen, von jeder Sorte 10 Teile Muskelgewebe fein zerschnitten zusammen in 100 Teilen absoluten Alkohols extrahiert werden. Nachdem man diese Mischung eine Woche lang bei Zimmer-Temperatur hat stehen lassen, ist sie gebrauchsfertig und bleibt unbegrenzt haltbar und wirksam, sofern man sie in demselben Gefäss zusammen mit den zerschnittenen Herzmuskelstückchen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dabei muss besonders hervorgehoben werden, dass die Herzen frisch sein und von gesunden Individuen stammen müssen. Wenn diese Bedingungen zutreffen, so sind die zu verschiedenen Zeiten bereiteten Extrakte absolut gleichwertig.

Patienten-Serum.

Einige Stunden nach der Gerinnung des Blutes wird das Serum abpipettiert und direkt $^1/_2$ Stunde bei 55 Grad Celsius inaktiviert. Es kann dann nötigenfalls einen oder zwei Tage im Eisschrank bleiben. Lumbalflüssigkeit wird nicht inaktiviert.

[1]) L. C.

Gebrauchsdosis.

Im Folgenden wird übersichtlichkeitshalber von 1 c.M³. als Volumen-Einheit ausgegangen. Wenn Sparsamkeit mit den Reagentiën betrachtet werden soll, so kann natürlich eine kleinere Flüssigkeitsmenge als Einheit benutzt werden.

Anstellung der Reaktion.

Vorversuch.

Dieser dient zur Bestimmung der K.-Einheit (d.i. die bei Vorhandensein der Gebrauchsdosis des Extraktes für die Haemolyse gerade benötigte Menge K) und von der Menge K., die für die Haemolyse im engeren Sinne (ohne Vorhandensein des Extraktes) erforderlich ist.

Von 5 Reagenzgläsern bekommt jedes:

1 cbcm. der 20 %-igen Polyvalenten Extrakt-Emulsion.

1 cbcm. physiol. NaCl.

1 cbcm. einer K.-Verdünnung, welche resp. 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 und 0.05 K. per cbcm. enthält.

In einer zweiten, aus 5 Reagenzgläsern bestehenden Reihe bekommt jedes:

2 cbcm. phys. NaCl.

1 cbcm. derselben K.-Verdünnungen.

Nach 1 Stunde bei 37 Grad Celsius bekommt jedes 2 cbcm. sensibilisierte Hammelblutkörperchen-Suspension.

Nach einer weiteren halben Stunde bei Bruttemperatur wird abgelesen, welche K.-Verdünnung noch vollkommene Haemolyse gibt und zwar zunächst in der ersten Reihe (meistens 0.03): das ist die K.-Einheit. Dasselbe geschieht alsdann in der zweiten Reihe (hier meistens 0.025).

Hauptversuch.

Dieser dient zur Bestimmung der Menge K., welche die Kombination von einer Gebrauchsdosis Patientenserum plus einer Gebrauchsdosis Extrakt maximal-spezifisch binden kann und damit ist die Stärkeziffer gegeben.

Von 5 Reagenzgläsern bekommt jedes:

1 cbcm. 5 mal verdünntes Serum oder unverdünnte Lumbal-Flüssigkeit.

1 cbcm. der 20%igen polyv. Extraktemulsion.

1 cbcm. einer K.-Verdünnung, welche resp. 1, 2, 4, 8 und 20 mal die gefundene K.-Einheit per cbcm. enthält.

Ein 6tes und 7tes Reagenzglas dienen als Serum- und Extraktkontrolle, und bekommen dementsprechend:

1 cbcm. 5 mal verdünntes Serum resp. 20%ige Extrakt-Emulsion.

1 cbcm. phys. NaCl.

1 cbcm. einer K.-Verdünnung, welche für das Extrakt-Reagenzglas eine K.-Einheit enthält und für das Serum-Reagenzglas die Menge K., die für die Haemolyse beim Fehlen des Extraktes als nötig befunden ist.

Nach einer Stunde bei 37 Grad Celsius werden 2 cbcm. sensibilisierte Hammelblutkörperchen-Suspension pro Reagenzglas zugefügt und nach weiteren 2 Stunden bei 37 Grad Celsius, abgelesen, d. h. die Stärkeziffer bestimmt, während ein bekanntes positives und negatives Serum den richtigen Verlauf des Versuches bestätigen.

Anmerkung.

Bei etwas grösserer Selbsthemmung des Serums ist die Serum-Kontrolle teilweise gehemmt und bei negativen Seris das erste Reagenzglas ebenso. Dies erschwert die Beurteilung nicht. Erweist sich das Serum als positiv, dann wird seine Stärkeziffer um 1 verringert.

Ist die Selbsthemmung ausnahmsweise besonders gross, dann kann die Serum-Kontrolle völlig gehemmt sein (die grösste Selbsthemmung beträgt ungefähr eine K.-Einheit). Wenn man frische Sera gebraucht, so kommt dies nur bei sehr starken positiven Seris vor; von der Stärkeziffer muss dann 2 in Abzug kommen. Man kann natürlich auch die Selbsthemmung austitrieren und bei Wiederholung der Reaktion in Rechnung bringen; bei alten oder verunreinigten Seris wird dies dadurch notwendig, weil die Selbsthemmung des Serums dann aussergewöhnlich hohe Werte zeigt. Es verdient jedoch bei weitem den Vorzug, in diesem Falle dasselbe Serum nochmals und dann frisch zu untersuchen.

Schluszfolgerungen.

1. Die im Vorversuch stattfindende genaue Austitrierung des K.-mittels der sensibilisierten Hammelblutkörperchen-Suspension macht uns mit den übrigens recht geringen Unterschieden in der Aktivität der verschiedenen K. bekannt und dadurch von ihnen völlig unabhängig.

2. Die, unter Berücksichtigung der durch die Gebrauchsdosis des Extraktes stattfindende K.-Absorption, für die Haemolyse genau benötigte Menge K. (K.-Einheit) ist dadurch ein geeigneter Masstab für die spezifische K.-Bindung, die überdies gegenseitige Vergleichung zulässt.

3. Die Anwendung der Menge des spezifisch gebundenen K. als Grundlage einer quantitativen Methode entspricht dadurch den Forderungen, die an ihre Zuverlässigkeit und an die Möglichkeit zur Vergleichung der Sera unter einander gestellt werden müssen.

4. Die oben angegebene Technik macht diese Methode zu einer für die Praxis ausserordentlich brauchbaren quantitativen Ausführung der Wassermannschen Reaktion.

DIE QUANTITATIVE WASSERMANNSCHE REAKTION.

Eine Kritik

VON

G. KAPSENBERG.

(Leiden).

Gegen die sogenannte quantitative WASSERMANNsche Reaktion führe ich Beschwerden prinzipieller und praktischer Art. Diese beziehen sich:

1°. auf die s.g. quantitative WASSERMANNsche Reaktion im allgemeinen;

2°. auf die Technik der Methoden, welche für quantitative gelten.

Ad 1. An ersterer Stelle musz festgestellt werden, welche Deutung die Vertreter der quantitativen WASSERMANNschen Reaktion dem Worte »quantitativ« beimessen. Diese ist doch *eine ganz besondere.* Verschiedene serologische Reaktionen (Agglutination, Präzipitation) werden quantitativ ausgeführt, und zwar mit dem Zweck den Grenzwert zu bestimmen bei welchem sie gerade noch hervortreten. Erst wenn die untersuchten Sera einen Grenzwert erreichen, *welcher durch die Zusammenwirkung von Klinik und Laboratorium bestimmt ist*, so wird die von ihnen gegebene Reaktion als positiv bezeichnet. Die quantitative Ausführung dieser Reaktionen ist *unbedingt erforderlich.*

Ganz andersartig sind die Verhältnisse bei der Komplementbindungsreaktion. Wenn diese nach den festgestellten Prinzipien ausgeführt wird und besonders *alle* erforderliche Kontrollen angestellt und in Betracht genommen werden, hat *jede* gelungene, tadellose Komplementbindungsreaktion Beweiskraft. Es ist nebensächlich, sogar gleichgültig, ob bei ihr viel oder

wenig Serum, viel oder wenig Antigen, viel oder wenig Komplement benutzt, bezw. gebunden wurde. *Hauptsache* ist die Feststellung eines *unzweideutigen spezifischen* Komplementschwunds. In gewissem Sinne ist jede Komplementbindungsreaktion »quantitativ«, da die zu benutzenden Substanzen abgestimmt werden sollen, aber es ist weder notwendig noch gebräuchlich einen gewissen Grenzwert für sie festzustellen, welcher erreicht werden musz, um eine Reaktion positiv nennen zu dürfen.

Was nur für die Komplementbindungsreaktion im allgemeinen gilt, musz auch bei der WASSERMANNschen Reaktion durchgeführt werden, da diese doch nach denselben Grundprinzipiën angestellt wird.

Die Vertreter der s.g. quantitativen W. R. bestimmen dennauch tatsächlich nicht einen Grenzwert, nach dem die Reaktion positiv oder negativ gedeutet werden soll. Allerdings ist dies höchstens *Folge* und kein *Zweck* der Methode. Der Zweck besteht darin: die *Intensität* der positiven Reaktion festzustellen um daraus Schlüsse zu ziehen z. B. betr. den Ernst der krankhaften Prozesse, bezw. ihre Besserung durch die Therapie zu kontrolliren. Die quantitative W. R. soll also nicht nur *diagnostisches Hilfsmittel* sein, aber auch *Gradmesser* krankhafter Erscheinungen.

Es scheint mir, dasz im allemeinen eine Reaktion, besonders wenn ihr Wesen noch völlig unbekannt ist, solches nicht leisten kann. Jedenfalls darf und soll nicht von *vornherein* angenommen werden, dasz Schwankungen in der Intensität einer Reaktion mit gleichsinnigen Schwankungen im Krankheitsprozesse Hand in Hand gehen. Das gilt nicht am mindesten für die W. R., bei welcher man nicht die geringste Einsicht hat in die inneren Verhältnisse, welche sie hervorgerufen haben, und deshalb auch kein Urteil, ob eine stärkere Reaktion eine gute oder schlechte Erscheinung genannt werden darf.

Wie selbstverständlich dies auch erscheinen möge, dennoch wurden und werden von Vertretern der quantitativen Methoden rein aprioristische Schluszfolgerungen aus den gefundenen »Indices« gezogen.

Es soll uns demnach nicht wundern, dasz besonders von klinischer Seite dagegen opponirt worden ist.

So erachtete BOUMAN es notwendig, in seinem Vortrage in dem XV. Holländischen naturwissenschaftlichen und medizinischen Kongress (April 1915, S. 405 der Verhandlungen) zu sagen: »*Einstweilen kann ich es noch nicht gutheissen, dasz wir von der Serologie dominirt werden.* Das gilt besonders wenn wir mit der Besprechung der Resultate der Salvarsantherapie (bei Dementia paralytica und Tabes) anfangen. Dürfen wir von einem Erfolg reden, wenn wir durch die Therapie eine Aenderung der Reaktion auftreten sehen? *Einstweilen nicht immer*, wenn wir, wie in einem unserer Fälle, eine Besserung finden, aber zugleich *eine Progression im klinischen Bilde.*«

Es ist m. E. ohne Zweifel *nur die Klinik*, welche über die Bedeutung einer quantitativen Methode maszgebend urteilen darf und ihr Urteil ist in diesem Falle gewisz nicht eindeutig, vielfach aber entschieden ablehnend. Ich komme gleich noch darauf zurück.

Zuvor möchte ich aber diese Fragen stellen:

Hat die Klinik an einer quantitativen W. R. Bedürfnis?

Braucht sie dieselbe für die *Diagnosestellung?*

Die Antwort auf letztere Frage musz bestimmt verneinend sein.

Denn, wenn die Technik der Reaktion mit ihrem eigentümlichen Verhalten Rechnung trägt, es sei dasz man die ursprüngliche beibehalten hat oder eine mehr empfindliche benutzt, bei welcher die Komplementmenge verringert ist, so genügen *für die Diagnose* die Andeutungen: positiv, negativ oder zweifelhaft u. d. [1]) vollständig. Der Grad der Positivität hat für sie gar keine Bedeutung. Ich gestehe sogar, dasz die Angabe des Grades der Reaktion in der Praxis dem Wert, welchen man der W. R. für die Diagnostik beimessen soll, viel geschadet hat und zu Unterschätzung und einem unerwünschten Misztrauen geführt hat. Viele Praktiker verbinden doch an *positiven* Werte wie 0,2—0,4, bezw. 2—4 die Deutung negativ. Dazu möchte ich nach folgendes bemerken: Nicht der Praktiker soll für die Beurteilung gesetzt werden ob die Reaktion positiv oder negativ gedeutet werden musz. Das ist die Sache und die Verantwortung

[1]) Es sei hierbei bemerkt, dass die quantitativen Methoden für die Grade der Reaktion, welche zwischen negativ und positiv liegen, keine, oder jedenfalls unzulängliche bezeichnungen haben.

des Serologen. *In der Verwertung der Reaktion bleibt der Praktiker doch immer völlig frei!*

Und ist es nicht ganz *falsch*, dasz der Praktiker sich eine eigene quantitative Beurteilung der quantitativen Methode bildet, indem er z. B. sagt: Indices van 0,2—0,4 fasse ich als negativ auf, oder haben keinen Wert für mich?

Hat also die quantitative W. R. für die Diagnose gar keinen Wert, so können wir uns fragen wie grosz ihre Bedeutung ist für die *Prognose*.

Faszt man die W. R. als eine Immunitätsreaktion auf, die, wie z. B. die Agglutination, mit Unempfindlichkeitsprozessen nur nebensächlich verknüpft ist, so musz es von vornherein ganz unwahrscheinlich erscheinen, dasz sie etwas aussagen kann über den Ernst des Leidens, also der Syphilis, wie auch die Intensität der GRUBER-WIDALschen Reaktion nicht gestattet Schlüsse in Bezug auf die Prognose einer Typhuskrankheit zu ziehen. Unabhängig von solcher Auffassung: jeder Experimentator weisz, dasz wenn zwei Tiere, welche soviel wie möglich mit einander übereinstimmen, mit demselben Antigen immunisirt worden sind, die Grösse der Antikörperproduktion bei beiden öfters sehr verschieden ist.

Am deutlichsten wird nun das oben angeführte praktisch bestätigt durch die Prinzipien worauf die älteste und am meisten ausgearbeitete Methode, nämlich diejenige von SORMANI, gegründet ist. Nach dieser Methode soll das Antigen geeicht werden mittels stark reagirenden Seren, welche also hohe Indices zeitigen. Man findet diese nun nicht nur bei den unheilbaren paraluetischen Krankheiten und bei hereditärer Lues, sondern auch bei der für die Therapie gut zugänglichen sekundären Lues, *ja sogar dann und wann auch im Initialstadium der Krankheit.*

LOMMEN hat (*Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.* 1914) mehrere Kurven publizirt, woraus man klar ersehen kann, dasz ein Kranker mit einem Σ. I. van $^{10}/_{10}$ ebenso schnell ein negatives Serum bekommen kann als einer mit niedrigem Index.

Selbst habe ich feststellen können, dasz das Serum eines Patienten mit sekundärer Lues eine nur schwache bis zweifelhafte Reaktion zeigte. Einer unmittelbar angestellten, kräftigen Behandlung ungeachtet wurde die W. R. entschieden positiv und erst ganz allmählich negativ.

Ich kann also nicht zugeben, dasz eine quantitative W. R. mit einiger Zuverlässigkeit für die Beurteilung der Prognose benutzt werden kann und auch hier soll die Unbekanntheit mit dem Wesen der Reaktion zur grösztен Vorsicht mahnen.

Dasz est nicht möglich ist, mittels einer quantitativen Methode mit genügender Sicherheit *die verschiedenen Stadien der Lues* zu unterscheiden, kommt mir nach dem obengesagten selbstredend vor. Auch gilt dieses für die Behauptung, dasz die quantitative Methode im Stande sein sollte *die verschiedenen Formen von Lues des Zentralnervensystems* aus einander zu halten.

In Bezug hierauf möchte ich nochmals etwas aus dem Vortrage BOUMANs zitieren (l. c. S. 405.—.)

Er fragt: »Ist es nun möglich, dasz mittels der Serologie ein Unterschied gemacht werden kann zwischen luetischen und den sogenannten paraluetischen Veränderungen? Man weisz, dasz man in den letzten Jahren allerhand wechselnde (sic! Verf.) Betrachtungen durchgemacht hat wobei Lues cerebri, Tabes und Paralyse verschiedene Resultate geben sollten. *Ausserhalb für Dementia paralytica, und auch dann nicht immer, dürfen wir uns nicht all zu fest auf die serologischen Reaktionen verlassen*".

Und in seiner Arbeit »Über luetischen Psychosen« (*Psychiatrische en Neurologische bladen*. 20. Jahrgang, 1916 S. 172) heiszt es: »Obgleich wir serologisch *vorsichtig* sein müssen,..... Und schlieszlich beweist der dritte von uns mitgeteilte Fall, dasz wir auch bei positiven Reaktionen in Liquor und Serum noch *vorsichtig* sein sollen....«

Zum Schlusz musz noch untersucht werden, welchen Wert die s. g. quantitative Methode für die *Kontrolle der Therapie* hat. Es ist natürlich völlig unerlaubt, aus der Tatsache, dasz die Indices bei einem Patienten niedriger werden ohne Rücksicht auf den klinischen Verlauf, auf Besserung des Leidens zu schliessen. Wie selbstredend dieses erscheint, so geschieht es dennoch täglich. SORMANI selbst gab hier das Beispiel. Als MEIJERs keine Besserung bei seinen Patienten konstatierte, ja sogar eine Verschlimmerung, während die Indices niedriger wurden, und daraus schlosz, dasz es keine zuverlässige Beziehung zwischen klinischen Erscheinungen und serologischen Reaktionen gibt, sagte SORMANI ironisch:

»Seine zehn Fälle (Dementia paralytica Verf.) besserten sich nicht mit dieser einzigen Kur (ausser oft serologisch, aber wir wissen nun, dasz ihm das völlig gleichgültig ist)«. (Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1916. I. S. 258).

Man weisz auch noch nichts bestimmtes über den Einflusz, welchen die antisyphilitische Kur an sich auf die Reaktion ausüben kann.

M. E. musz die Bedeutung einer quantitativen W. R. für die Beurteilung der Behandlung überhaupt als sehr geringfügig eingeschätzt werden. Da bei einer völligen Heilung die Reaktion (höchstwahrscheinlich immer) völlig negativ wird, so soll der Praktiker stets versuchen sie negativ zu machen und er darf nicht zufrieden sein mit einer blossen Erniedrigung des Index. Hier liegt aber gerade in der quantitativen Methode eine nicht geringe Gefahr. Denn ein Arzt, der nach seiner Erfahrung meint, niedrigen Indices keinen Wert beilegen zu dürfen, wird einen Luetiker vielleicht zu früh für geheilt erklären. Besonders verkehrt ist es, wenn dem Patienten mitgeteilt werd, dasz seine Indices niedriger werden, (was dennoch öfters geschieht). Er erachtet dann weitere Behandlung leicht für übertrieben und kommt nicht mehr zurück.

Es sei mir gestattet noch einige kleineren, allgemeinen Beschwerden anzuführen. Da die quantitative Methoden mehr Substanz (besonders gilt dies für das Patientenserum und für das Komplement) erforderen, wie die gewöhnliche, so ist die Neigung entstanden Mikromethoden anzuwenden, welche, wie genau sie auch ausgeführt werden, die Zahl der Fehlerquellen erhöhen.

Auch wird zur Vereinfachung vielfach nur mit einem Antigen gearbeitet, was die Zuverlässigkeit der Reaktion nicht erhöht, da, dann und wann, die Anwendung mehrerer Antigene deutliche Vorteile zeigt.

Schon im Anfang der WASSERMANN-Area hat man die Erfahrung gemacht, dasz ein etwas älteres Serum kräftiger reagirt als ein ganz frisches. Die Indices sind deshalb auch vom Intervall zwischen Blutentnahme und Ausführung der Reaktion abhängig. SORMANI forderte deshalb, dasz die Seren innerhalb 24 Stunden nach der Blutentnahme untersucht werden sollten. Das ist aber in der Praxis schwer durchführbar und

beim einfachen qualitativen Arbeiten, wiewohl wünschenswert, nicht erforderlich.

Ad 2. Die Kritik auf die Technik der Methoden, welche für quantitativ gelten, wird wesentlich durch die Tatsache erleichtert, dasz Herr VAN HASSELT, Vertreter der SORMANIschen Methode, tatsächlich selber Kritik ausübt, indem er sagt, dasz er sich »nicht für berechtigt hält einen Urteil über die am meisten zu bevorziehende Methode auszusprechen«, und also die SORMANIsche Methode nicht als eine unbedingt zuverlässige vorstellt.

Welchen Anforderungen musz nun eine wirklich gute quantitative Methode mindestens gewachsen sein?

Doch wohl diesen, *dass sie wo auch, wann auch und von wem auch ausgeführt bei einem selben Serum immer denselben Wert gibt.*

Einstweilen scheint es mir, dasz weder die W. R., noch überhaupt irgend eine Komplementbindungsreaktion solchen Anforderungen entsprechen kann. Die Substanzen, mit welchen die Reaktion ausgeführt wird, sind dazu viel zu veränderlich und unbeständig. Der mehr oder weniger ausgedehnte Vorversuch ist davon der Zeuge und so paradoxal es auch klingen darf, doch wage ich es den Satz zu poniren, dasz eine wirklich zuverlässige quantitative Methode Vorversuch und Kontrollen entbehren können musz, da sie nur mit beständigen Grössen arbeiten darf. Und dasz ist bis jetzt bei keiner Methode der Fall.

Betrachten wir z. B. nur das Antigen, so wird bei der SORMANIschen Methode ein spezifisches und bei der von WIGGER-BOELENS ein unspezifisches empfohlen. Arbeitet man bei der SORMANIschen Methode mit verschiedenen Extrakten, so bekommt man wechselnde Werte und es wird dort sogar verlangt, dasz man die Behandlung eines Patienten mit demselben Extrakte kontrolliren soll! Von einer Allgemeingültigkeit ist also keine Rede!

Es scheint mir erforderlich, dasz eine quantitave Methode immer bei konstanter Temperatur ausgeführt wird.

Der Brutschrank ist unzuverlässig, denn die Temperaturen

wechseln in ihm sehr bedeutend, je nachdem viel oder wenig Röhrchen auf einmal in ihm gestellt werden.

Deshalb sollte bei einer quantitativen Methode unbedingt ein Wasserbad, am besten mit Ruderapparat benutzt werden. Das geschieht weder bei der SORMANIschen noch bei der WIGGER-BOELENSschen Methode.

Was nun mehr speziell die *Sormanische Methode* anbelangt, so wird bei ihr die Intensität der Reaktion dadurch gemessen, dasz Abstufungen des Extraktes gegenüber sich gleichbleibenden Serummengen geprüft werden.

Um die Abstufungen zu bestimmen soll das Extrakt »geeicht« werden. Die gröszte Extraktmenge, welche benutzt werden darf, wird ziemlich willkürlich gewählt; sie soll nicht zu viel Komplement unspezifisch binden.

Die kleinste Menge wird aber so genau wie möglich bestimmt und zwar durch Prüfung mit mehreren stark reagirenden Seren. Es besteht also keine Sicherheit, dasz die starken, Seren welche der eine Untersucher für die Eichung benutzt, mit denen eines anderen übereinstimmen, wobei noch zu bedenken ist, dasz die Eichung von den verschiedenen Untersuchern ausgeführt werden musz mit Substanzen (Blutkörperchen, Ambozeptor, Komplement) welche nicht konstant sind. Oben wurde schon bemerkt, dasz verschiedene Extrakte bei der SORMANIschen Methode verschiedene Werte geben, auch wenn *eine* Person sie genau anwendet. Eine Eichung durch verschiedene Untersucher, jeder für sich, kann deshalb niemals übereinstimmende Werte ergeben. Bei der SORMANIschen Methode sollte demgemäss von jedem Untersucher dasselbe Antigen benutzt worden, also ein Standardantigen, das so stabil wie möglich ist [1]) und von *einer* Person, bezw. in *einem* Institute gegen verschiedene Seren geeicht worden ist.

Da die obere Grenze für die gröszte zu benutzende Extraktmenge *gewählt, geschätzt* wird, und *nicht* genau bestimmt, sondern tatsächlich willkürlich festgestellt wird, und die niedere

[1]) Dazu käme vielleicht ein Antigen in Betracht, das pulverisiert aufgehoben und jedesmal in bestimmter Menge, für jede W. R. mit Alkohol ausgezogen wird, etwa in der Weise wie ich das für das Menschenherz und Rinderherz beschrieben habe. (*Nederl. Tijdschr. v. Geneeskunde* 1914, und *Münch. med. Woch.* 1918).

Grenze bei den verschiedenen Untersuchern ebenfalls Schwankungen unterworfen ist (also wenn nicht ein standardisiertes Antigen benutzt wird), so sind die 5 Abstufungen auch willkürlich und *müssen* verschiedene Untersucher wohl verschiedene Indices bei einem selben Serum finden. Dabei ist noch zu bedenken, dasz auch Emulsionen, welche mit einem selben Extrakt dargestellt worden sind, sich nicht immer völlig gleich sind.

Die Zahlen, welche für die Indices gewählt sind, sind mehr praktisch als wissenschaftlich. Man kann mit ihnen zufrieden sein, wenn man sich nur immer vor Augen stellt, dasz sie *an sich* tatsächlich nichts sagen und dasz ein Serum mit Σ. I. = 0,4 nicht 2 fach so stark ist als eines mit Σ. I. = 0,2.

Es ist ein Fehler bei der SORMANIschen Methode, welcher auch von Herrn WIGGER BOELENS empfunden worden ist, dasz die Komplementmengen in den verschiedenen Röhrchen (besonders gilt dieses für die ersten zwei oder drei), tatsächlich *nicht* gleich sind, sondern vom ersten bis zum letzten Röhrchen relativ wachsen. Die verschiedenen Mengen des Extraktes binden doch verschiedene Komplementmengen. Die Methode arbeitet also mit 2 veränderlichen Grössen. Man sollte deshalb entweder einen Extrakt verwenden, der gar kein Komplement bindet, oder die Komplementmengen in den verschiedenen Röhrchen genau mit einander übereinstimmen lassen.

Weiter musz ich auf die zu hohe Empfindlichkeit des ersten Röhrchens hinweisen. In diesem befindet sich doch nicht mehr Komplement als *gerade* genügt für eine völlige Hämolyse. Eine geringe Serumhemmung, welche in der Kontrolle nicht wahrgenommen wird, kann schon von Einfluss sein und wenn eine geringe Wechselwirkung zwischen Antigen und Serum stattfindet, also eine (niemals beträchtliche) »normale« W. R. hervortritt, so zeigt dieses Röhrchen eine deutliche Hemmung. Nun läszt sich hiergegenüber wohl anführen, dasz man öfters feststellen kann, dasz ein Serum die Eigenhemmung des Extraktes verringert oder aufhebt. Es kommt aber auch das umgekehrte vor (siehe auch KAUP); nach meiner Erfahrung besonders wenn das Serum einige Tage alt oder leicht infiziert ist. Auch spielen in diesem Röhrchen kleine, fast unvermeidliche technische Fehler eine zu grosse Rolle. Das erste Röhrchen *kann* vorzügliche Resultate geben, doch es ist nicht gestattet

sich darauf zu verlassen, zumal wenn man 0,2 (in der Mehrheit der Fälle nicht zu Unrecht) als positiv bezeichnet.

Alles in allem kann ich in der SORMANIschen Technik keine Methode erblicken, welche mit Recht quantitativ genannt wird.

Die Methode Wigger-Boelens hat als Grundsatz die nicht unangreifbare Auffassung, dasz die W. R. eine Komplementbindungsreaktion darstelle. Wie dem auch sei, es ist jedenfalls nicht unlogisch, dasz festgestellt wird, wie viel Komplement im gegebenen Fall von der Kombination Antigen-Serum gebunden wird.

Entspricht nun diese Methode den auf Seite 172 aufgestellten Anforderungen?

Herr WIGGER BOELENS behauptet, dasz wir in den sensibilisierten Blutkörperchen einen für jede W. R. gleichbleibenden Faktor besitzen.

Das musz ich doch sehr anzweifeln.

Die roten Blutkörperchen, als lebende Elemente einem Organismus entnommen, *können* nicht immer gleich sein. Der Zeitraum, welcher verläuft zwischen der Blutabnahme beim Schafe, und der Anwendung der Blutkörperchen, Konstitutionsanomalien des Tieres, u. s. w. sind von Einflusz auf die Löslichkeit. Die Qualität der verschiedenen Ambozeptoren, z. B. ihre verschiedene agglutinatorische Kraft, sind bei der Sensibilisierung nicht ohne Bedeutung.

Nehmen wir an dasz zwei Untersucher, A und B, das gleiche Komplement benutzen, dasz die übrigen Substanzen sowie die Verhältnisse einander völlig gleichen, dasz aber die sensibilisierten Blutkörperchen etwas verschieden sind.

A erhält nun z.B. als Komplementeinheit p_1 und B p_2. und p_2 sei $> p_1$. Da die Verhältnisse übrigens übereinstimmen, wird bei beiden Untersuchern von der Kombination Serum-Antigen dieselbe maximale Menge des Komplementes gebunden, welche wir q nennen. A findet also für das Serum den Wert $\frac{q}{p_1}$ und B $\frac{q}{p_2}$. Also ist der Index von A $\frac{p_2}{p_1}$ fach so grosz als der von B.

Wählen wir nun für p_1 und p_2 einige Zahlen, welche tatsächlich vorkommen:

p_1 sei 0,03 und p_2 sei 0,04: $\frac{p_2}{p_1} = 1\,1/3$

p_1 » 0,02 » p_2 » 0,03: $\frac{p_2}{p_1} = 1\,1/2$

p_1 » 0,02 » p_2 » 0,04: $\frac{p_2}{p_1} = 2$

Durch kleine Verschiedenheiten in den sensibilisierten Blutkörperchen können also zwei Untersucher schon Indices bekommen von denen einer zweifach so grosz ist wie der andere.

Auch musz in Betracht gezogen werden, dasz die hämolytische Wirkung eines Komplementes nicht mit seiner spezifischen Ablenkbarheit parallel zu sein braucht, m.a.W. dasz mit der Bestimmung der »haemolytischen» Komplementeinheit nicht zugleich eine »Ablenkungs«-einheit festgestellt wird.

Wenn die letztere grösser ist (z.B. beim schwächeren Komplement), so werden die gefundenen Indices natürlich höher.

Die Qualität des Extraktes ist auch bei der WIGGER-BOELENSsche Methode von entschiedener Bedeutung. Extrakte mit gleicher Eigenhemmung können doch ganz verschiedene Bindungskraft zeigen. Wie bei der SORMANIschen Methode ist es bei der WIGGER-BOELENSschen unbedingt erforderlich, dasz alle Untersucher mit demselben Antigen, und zwar ein geprüftes Standardantigen arbeiten.

Dieselbe Beschwerden, welche ich gegen die Beweiskraft des ersten Röhrchen bei der SORMANIschen Technik anführte, gelten auch für die WIGGER-BOELENSsche Methode. Auch hier sind die Reagenzien in derartigen Quantitäten vermischt, dasz die Empfindlichkeit zu grosz ist.

Die Abstufungen des zugefügten Komplementes gehen ausserordentlich weit auseinander. Von 10 Komplement-Einheiten auf 20 is gar nicht wenig. Die Bezeichnung mittels Zahlen ist bei WIGGER BOELENS noch willkürlicher als bei der SORMANIschen Methode: sie sind unwissenschaftlich und an sich nichtssagend. Der Praktiker musz sich seiner Schuljahre erinnern, um ihre etwaige Bedeutung fest zu stellen.

Schlieszlich hat mich in der Methode WIGGER-BOELENS noch etwas als unlogisch getroffen. Das ist die Wahl der Komplementeinheit. Diese is nicht die minimale Menge des Komplementes,

welche an sich völlige Hämolyse herbeiführt, sondern die minimale Menge, welche diese verursacht in Gegenwart der Gebrauchsdosis des Antigens. Diese Einheit wird nun multipliziert mit 2.5, 5, 10 und 20.

Diese Steigerung stimmt aber nicht mit der wirklichen, in den verschiedenen Röhrchen für die Hämolyse vorrätige Komplementmenge; denn die in allen Röhrchen gleiche Menge des Extraktes an sich zieht jedesmal nur 1 Mal das ihr zukommende Komplement zu sich. Dasz dieses nicht ganz ohne Bedeutung ist möge folgendes beweisen.

Die Menge des Komplementes, welche für eine völlige Lysis, bei Abwesenheit des Antigens, genügt sei *m*.

Untersucher A arbeitet mit einem Antigen, das eine Menge *a* des Komplementes unspezifisch bindet und der Untersucher B gebraucht ein Antigen, dasz in derselben Weise eine Menge *b* ausser Wirkung setzt.

Die Komplementeinheit ist also nach WIGGER BOELENS für A=m+a und für B=m+b, und die Menge des Komplementes, welche den Röhrchen zugesetzt werden, sind also:

für A: m + a; 2,5 m + 2,5 a; 5 m + 5 a; 10 m + 10 a; 20 m + 20 a;
für B: m + b; 2,5 m + 2,5 b; 5 m + 5 b; 10 m + 10 b; 20 m + 20 b;

und die wirklich für die Hämolyse verfügbaren Komplementmengen sind:

für A: m; 2,5 m + 1,5a; 5 m + 4 a; 10 m + 9 a; 20 m + 19 a;
für B: m; 2,5 m + 1,5 b; 5 m + 4 b; 10 m + 9 b; 20 m + 19 b;

Sei nun z. B. m = 0,02; a = 0,01 = 1/2 m; b = 0,02 = m so finden wir als die wirkliches Mengen, womit Hämolyse stattfinden kann:

für A: m; 3,25 m; 7 m; 14,5 m; 29,5 m;
für B: m; 4 m; 9 m; 19 m; 39 m.

Also: im vierten Röchrchen befinden sich bei A 14,5, bei B 19, und im fünften bei B sogar 39 gegen bei A 29,5 „wirkliche" Komplementeinheiten.

Solche Differenzen können *leicht* bei verschiedenen Untersuchern vorkommen. Sie sind aufzuheben, indem man die «wirkliche« Komplementeinheiten multipliziert und jedem Röhrchen die von Antigen gebundene Komplementmengen extra hinzufügt.

Auf dem hervorbringen kleinerer Beschwerden möchte ich verzichten; auch die WIGGER-BOELENSsche Methode entspricht m. E. nicht den Anforderungen, welche eine Methode mit Recht als quantitativ betrachten lassen.

Vielen von meinen Argumenten mögen theoretisch erscheinen. Dennoch soll die Theorie bei der Ausführung der W. R. auch ein Wort sprechen. Die praktische Resultate aber, welche die sogenannten quantitativen Methoden gegeben haben, sind weit davon entfernt schön zu sein.

Wenn man Stichproben nimmt, so gehen die Indices wirklich dermassen auseinander, dasz die Unzuverlässigkeit klar hervor tritt. [1])

Zusammenfassend möchte ich folgendes feststellen:

1. Von vornherein ist es sehr unwahrscheinlich, dasz es mittels einer Reaktion überhaupt, und mittels der W. R. im besonderen, gelingen wird (wie die Vertreter der quantitativen Methoden sich vorstellen), *Diagnose*, *Prognose*, *Stadium* und *Verlauf* einer Krankheit i. c. der Syphilis festzustellen.
2. Die Veränderlichkeit der verschiedenen Substanzen mit welchen die W. R. ausgeführt wird, macht es sehr fraglich ob eine gute quantitative W. R., das heiszt eine Reaktion, welche zu jeder Zeit, von jedem Untersucher und in jedem Institut ausgeführt, stets übereinstimmende zuverlässige Werte giebt, zu erfinden ist.
3. Die Methoden von SORMANI und von WIGGER BOELENS entsprechen den obengenannten Anforderungen nicht.
4. Für die Praxis ist die *quantitative* W. R. entbehrlich und von sehr fraglicher Bedeutung. Unzuverlässige Methoden sind für die praktische Verwertung der W. R. sogar als gefährlich zu betrachten. Die Praxis braucht an ersterer Stelle *qualitativ* zuverlässige Methoden.
5. Eine Methode darf nur dann mit Recht quantitativ genannt werden, wenn die *Klinik* ihren Wert und ihre Zuverlässigkeit unzweideutig festgestellt hat.

[1]) Man lese den Vortrag V. D. VALKS und die anschliessende Diskussion in der *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.* 1918. 2e Hälfte H. 8, S. 605 u.f.

Le Journal „Folia Microbiologica" publie des articles originaux, principalement de microbiologistes hollandais, des revues générales et c. q. de la bibliographie, mais non pas des analyses d'autres journaux. Les articles d'étrangers ne sont pas exclus.

Les travaux paraissent en français, allemand ou anglais. Le journal publie e. a. le compterendu des séances de la Société Néerlandaise de Microbiologie.

Les auteurs reçoivent gratuitement 50 tirages de leurs articles.

Le Journal paraît en fascicules 2—3 fois par an. Le prix du volume d'environ 300 pages avec illustrations et registre, pour ceux qui ne sont pas membre ordinaire de la Société Néerlandaise de Microbiologie) est de fl. 12.— (frais de poste non compris).

Les articles que l'on désire publier dans les „Folia Microbiologica" peuvent être adressés à un des membres de la Rédaction.

The Journal „Folia Microbiologica" contains original articles, primarily by Dutch microbiologists; further general reviews, and eventually reviews of books, but no ordinary reference. Contributions from foreigners are not excluded.

The articles are published in English, French or German.

The Periodical publishes a. o. the transactions of the Dutch Microbiological Society.

Authors receive 50 copies of their articles gratuitously.

The Periodical appears serially, in 2—3 numbers a year, at irregular intervals. The subscription-fee for a volume of ± 20 sheets of printed matter, with illustrations and register is *f* 12.— (not post free).

(For non ordinary members of the Dutch Microbiological Society).

Articles, to be published in the „Folia Microbiologica", may be sent to any of the editors.

BECKER'S SONS

BRUMMEN (GELDERLAND).

FILIAAL: VAN BRAKELSTRAAT 29*a*.

ROTTERDAM.

FABRIKANTEN VAN WETENSCHAPPELIJKE CHEMISCHE, PHARMACEUTISCHE EN ANDERE SOORTEN

BALANSEN EN GEWICHTEN

LEVERANCIERS AAN ALLE BINNEN- EN BUITENLANDSCHE UNIVERSITEITEN, LABORATORIA, MUNTEN, DE VERSCHILLENDE DEPARTEMENTEN — VAN BESTUUR, ENZ. ENZ. —

BEKROOND MET DE HOOGSTE ONDERSCHEIDINGEN OP ALLE WERELDTENTOONSTELLINGEN

WERELDTENTOONSTELLING TE LUIK
BUITEN MEDEDINGING, LID DER JURY

New York Botanical Garden Library
3 5185 00251 5276